ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción

"Desarrollo de un snack cárnico fermentado-seco-madurado, con valor funcional y estabilidad organoléptica, utilizando cepas de microorganismos fermentadores y cepas probióticas."

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERA DE ALIMENTOS

Presentada por:

Irina del Carmen Torres Ruilova

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2008

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por darme la vida y la sabiduría para culminar esta etapa, a mi Director de Tesis, Ing. Patricio Cáceres., que con su empeño y dedicación compartió sus conocimientos siendo un formador en mi vida; y, por su invalorable ayuda, de igual forma a la Ing. Ana María Costa., y a la Ing. Grace Vásquez, a mis familiares y amigos por estar siempre junto a mí.

DEDICATORIA

A mis padres

A mi hermano Bismark

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Ing. Priscila Castillo S.
DELEGADA POR EL
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTA

Ing. Patricio Cáceres C.
DIRECTOR DE TESIS

Ing. Ana Maria Costa V.
VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad del contenido de ésta Tesis de Grado, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL"

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)

IRINA TORRES RUILOVA

RESUMEN

El salame o salami proviene desde siempre de Hungría y también se dice que del norte de Italia, este tipo de embutido se difunde también en nuestro país y en varias naciones de Latinoamérica, se conoce mucho como salchichón. Este producto cárnico es otra opción para consumir carne; posee buenas propiedades organolépticas y es aceptado en el mercado, por lo cuál se lo eligió como guía para este proyecto.

Esta tesis presenta el desarrollo de un producto fermentado-seco-madurado, tipo salame, a manera de snack utilizando cepas comunes de fermentación y cepas probióticas. El objetivo es desarrollar un snack cárnico con características organolépticas duraderas y propiedades funcionales que aporten a más de una nutrición sana una mejora en la salud del consumidor.

Para ello por medio de pruebas piloto y microbiológicas, se determinó la formulación del embutido, el tipo de bacterias de fermentación y cepas probióticas las cuales darán las propiedades al producto; donde el principal reto es mezclar las cepas, lograr un crecimiento adecuado y obtener un alimento seguro, funcional y organolépticamente aceptable.

En la parte inicial se define el tipo de productos secos-fermentados como el salame, cepas probióticas, cultivos cárnicos y procesos de elaboración.

Enseguida se describen las pruebas experimentales, tomando como punto de partida el diseño del experimento, seguido de un análisis discriminatorio de todas las muestras, para escoger la más adecuada y así economizar tiempo y recursos. El producto final fue sometido a evaluación sensorial, seguido del análisis estadístico para encontrar similitudes o diferencias y aceptación del consumidor.

Finalmente se presenta la determinación de las operaciones de producción y la selección de equipos necesarios para cada etapa del proceso.

El producto final obtenido es un salame a manera de snack con pH, humedad, contenido de proteínas y grasa adecuadas; cumpliendo normas vigentes. Así mismo comprobando que la cantidad de probióticos sea la necesaria para ser considerado alimento funcional, además de las propiedades organolépticas preferidas para este tipo de producto.

ÍNDICE GENERAL

Pág.

ABREVIATURAS

Aus	Ausencia
a_w	Actividad de Agua
°C	Grados Centígrados
Fig	Figura
Gr	Gramos
Kg	Kilogramo
Mg	miligramos
Ml	mililitros
Máx	Máximo
Min	Minuto
NMP	Número más probable
Pres	Presencia
Ref	Referencia
UFC	Unidades Formadoras de Colonia

SIMBOLOGÍA

%	Porcentaje
#	Número
NO	Oxido Nitrico
NO_2	Nitrito
NO_3	Nitrato
NaCl	Cloruro de Sodio

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

ÍNDICE DE TABLAS

Pág.

INTRODUCCIÓN

Tener una flora intestinal estable y bien equilibrada es una garantía de buena salud puesto que evita la colonización y el sobre desarrollo de microorganismos patógenos. Por lo tanto, la introducción de cepas bacterianas beneficiosas o probióticas dentro del tracto gastrointestinal es una opción atractiva para restablecer el equilibrio microbiano y prevenir la enfermedad a través de dietas; esto se consigue con los llamados "alimentos funcionales", cuya incorporación en nuestra dieta ha demostrado influir de forma específica y positiva sobre algunas funciones del organismo.

En el presente trabajo se trata el "desarrollo de un snack cárnico fermentado-seco-madurado con características organolépticas duraderas y propiedades funcionales", que tiene su enfoque principal en el uso de bacterias probióticas beneficiosas para la salud, además el crecimiento necesario de éstas en el alimento.

En base a pruebas piloto y de laboratorio se determinó la fórmula adecuada para el desarrollo del snack cárnico considerando características como sabor, olor, textura y color, en especial la cantidad de bacterias probióticas que han crecido. También se realizaron análisis microbiológicos demostrando la ausencia de bacterias patógenas.

Por medio de pruebas estadísticas de dos pares se determinó que la muestra no representa diferencia significativa comparándose con el salame tradicional.

Finalmente se presenta el diseño del proceso de elaboración

Por medio de prueba estadísticas de dos pares se determinó que la muestra no presenta diferencia significativa comparándose con el salame, presente ya en el mercado.

CAPITULO 1

1. GENERALIDADES.

1.1 Productos Fermentados -secos-madurados.

El conocimiento de los principios de la fermentación de la carne se desarrolló lentamente y no fue sino hasta los años 40 cuando se hicieron los primeros intentos para establecer las bases científicas del proceso de fermentación, siguiendo el desarrollo de los cultivos iniciadores.

Embutidos Fermentados.

La búsqueda de soluciones para la conservación de los alimentos ha estado ligada desde la prehistoria a la evolución humana, y aún hoy es un reto para la humanidad. Entre los métodos de conservación más utilizados desde la antigüedad destacan el secado y la fermentación.

La fermentación representa probablemente uno de los procesos biotecnológicos más antiguos. Esta técnica que se ha utilizado desde la Prehistoria para la conservación de alimentos durante periodos prolongados de tiempo, consume poca energía y da lugar a un producto de elevada calidad, (Molly 1997).

La fermentación de alimentos se desarrollo de forma empírica durante muchos siglos sin que se conocieran sus fundamentos científicos, actualmente sabemos que en los procesos fermentativos tiene una participación decisiva la microbiota presente en cada producto; los microorganismos fermentadores no sólo participan en la estabilidad microbiológica del alimento fermentado, sino que también contribuyen a sus propiedades organolépticas.

Definición:

Un producto cárnico fermentado-seco-madurado generalmente se define como una emulsión de carne y partículas de grasas, sal, agentes de curado, especies, etc., el cual se embute en tripas se lo fermenta y se lo seca. Durante el período de fermentación los azúcares de la mezcla se convierten en ácido láctico debido a las bacterias ácido lácticas y el agua migra a la superficie donde se evapora. Estos procesos dan por resultado un embutido con un pH más bajo y una actividad de agua reducida lo que nos da un embutido final estable con una larga vida útil aunque no haya recibido un tratamiento térmico.

Roca e Incze (1990) basándose en el tiempo de fermentación y maduración del embutido proponen una clasificación para embutidos fermentados (Tabla.1).

TABLA 1.
CLASIFICACIÓN DE EMBUTIDOS FERMENTADOS

Tipo de embutido	**Tiempo de producción**	**Pérdida de Agua (%)**	**Valor aw final**
Untable	3 - 5 días	34 - 42	0,95 - 0,96
Lonchable:			
Proceso corto	1 - 4 semanas	30 - 40	0,92 - 0,94
Proceso largo	12 - 14 semanas	20 - 30	0,85 - 0,86

Fuente: Roca e Incze (1990). Fermented sausages

Se distinguen los productos loncheables que serán consumidos en lonchas más o menos finas (jamones, embutidos curados, etc.) y los productos untables (cremas y mousses, patés untables, etc.), cuya textura permite su extensión sobre una tostada. Esta clasificación es arbitraria debido a que existen numerosos productos intermedios.

Salame:

El principal producto cárnico fermentado es el salame el cual es generalmente muy sazonado y de consistencia dura. Se prepara a partir de carne selecta triturada la cual se mezcla con agentes curantes y especias, después se lleva a bajas temperaturas y se embute se seca ya sea por aire o por humo a altas temperaturas y condiciones de humedad controlada. En este periodo cuando se lleva acabo la fermentación y la producción de ácido láctico lo que le proporciona el sabor y color característico. El periodo de secado es de 1 – 6 semanas dependiendo de la temperatura y del grosor del producto. La pérdida de humedad es del 20 – 30%. A bajas temperaturas sin embargo el crecimiento de las bacterias es muy lento y la producción de ácido láctico es menor que cuando se almacena a altas temperaturas, a altas temperaturas puede haber un crecimiento descontrolado de bacterias produciendo bacterias no deseadas y gran cantidad de ácido láctico (Pederson 1979).

1.2 Ingredientes y Aditivos

Sal

La adición de sal es esencial para la elaboración de embutidos crudos (Leistner, 1992). Además de ser un ingrediente que mejora el sabor su importancia tecnológica radica en su influencia sobre múltiples reacciones de los procesos de maduración y desecación. Además, adicionando sal se reduce el valor de la a_w con lo que se restringen las condiciones de desarrollo de algunos microorganismos indeseables. La sal ejerce un papel primordial en la ligazón de la pasta ya que interviene en la solubilización de las proteínas cárnicas, permitiendo que formen una película adhesiva que propicia que las partículas de carne se intercalen entre las partículas de grasa (Varnan y Sutherland, 1998). Generalmente se agrega a la mezcla del embutido 2.0 – 3.5%

Nitratos y Nitritos

Se trata de aditivos denominados de salazón, cuyo papel bacteriostático es fundamental antes que ningún otro.

Se agregan nitrato y nitrito a la mezcla del embutido para conseguir el color curado característico. Tradicionalmente el nitrato era agregado como el único agente de curado además de la sal pero actualmente es más frecuente agregar nitrato junto con nitrito. La cantidad agregada de nitrito se encuentra en el rango de 50 – 200mg/kg., y de nitrato entre 20 – 600 mg/kg., pero algunos productos se elaboran tradicionalmente con mucho más nitrato, por ejemplo el salame de Hungría que puede contener hasta 1700 – 1900 mg/kg., El nitrito promueve el establecimiento de bacterias ácido lácticas y especies *Micrococcaceae* pero puede inhibir bacterias ácido lácticas si se agrega en cantidades excesivas.

Formación del color:

El color de la carne fresca es consecuencia del contenido de mioglobina y oximioglobina que tienen tonos de color púrpura y rojos brillantes pero no son muy estables. Durante la producción del embutido, la mioglobina y la oximioglobina son transformadas a través de un número de reacciones, incluyendo el nitrito, en la más estable Nitrosilmioglobina y que es de un rojo oscuro y otorga al embutido el típico aspecto rojizo amarronado.

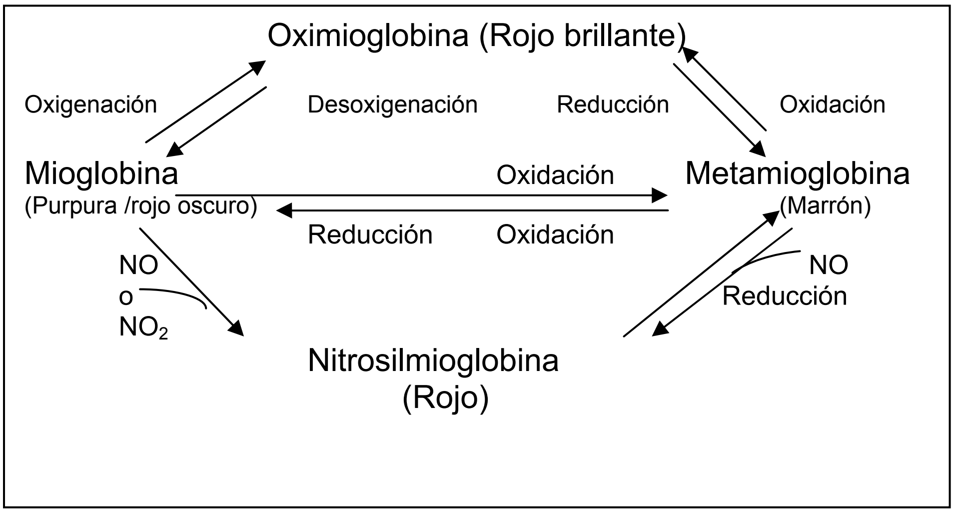


FIGURA 1.1. Esquema simplificado de las reacciones responsables de la formación del color.

Durante la preparación de la mezcla del embutido, el nitrito agregado actúa como un oxidante muy reactivo y se reduce rápidamente en óxido nítrico (NO) paralelo a la formación oxidativa de metamioglobina (el átomo de hierro en el grupo hemo de la molécula es oxidado del estado ferroso (Fe^{2+}) al férrico (Fe^{3+}). Esto resulta en una decoloración grisácea inmediata de la mezcla. Luego, en el proceso el NO reacciona con la metamioglobina y la Mioglobina para formar nitrosilmioglobina, convirtiendo simultáneamente el color grisáceo en rojizo. Esta reacción es promovida en condiciones de reducción, ya que el átomo de hierro en la metamioglobina debe ser reducido a Fe^{2+}. La figura 1.1 muestra un esquema simplificado de la reacción.

Pirofosfato.

El pirofosfato es una forma hidrolizada del polifosfato, y es usado en los productos picados. Son quelantes de cationes di y trivalentes, en particular, calcio, magnesio, hierro y níquel. Por esto proporciona capacidad emulsificante a las proteínas. Numerosos trabajos muestran una inhibición o por lo menos un freno del crecimiento de diversos microorganismos patógenos entre los cuales se encuentran:

Pseudomonas, Micrococcus, Staphylococcus, Streptococcus, Enterobacteriaceae, Bacillus y Clostridium perfringes. En tanto que inhibidores se piensa que los polifosfatos pueden quelar los metales bivalentes como el níquel, cobalto, cobre y zinc que intervienen en la cadena respiratoria de las bacterias y en la estructura de sus membranas. No obstante, los polifosfatos también pueden representar un aporte de fósforo para su crecimiento.

Dextrosa

El contenido de glucosa de la carne de vaca y cerdo fresco post-rigor está en el orden de los 0.08-0.1% lo cual no es suficiente para producir cantidades significativas de ácido láctico. En consecuencia, azúcares como la dextrosa se agregan a la mezcla del embutido como sustrato de fermentación para las bacterias ácido lácticas. Por lo general se agrega 0.4-1.0% de esta azúcar a la mezcla.

Tripas.

Se llama tripa a un envoltorio cilíndrico que permite dar forma y protección a ciertos productos de charcutería crudos, cocidos, o que hayan sufrido un secado – maduración. Este envoltorio puede ser natural o artificial. Son muchos los tipos de tripas utilizadas en charcutería.

Tripas Naturales.

Son obtenidas a partir del tubo digestivo de los porcinos, bovinos, ovinos y equinos, sin ninguna transformación. Se utilizan desde la antigüedad para la elaboración de morcillas y salchichas.

Manufacturadas; en este caso varias porciones de tripas naturales van cosidas o pegadas entre ellas.

Tripas colágenas de fibras animales.

El colágeno utilizado para la elaboración de estas tripas se obtiene a partir de la dermis de las pieles de los bovinos. Las pieles son seleccionadas en el matadero para asegurar las máximas garantías higiénicas y alimentarias. Existen dos tipos de tripas de colágeno.

Tripas comestibles: Elaboradas con colágeno puro. Estas presentan pequeños calibres (17 a 43), se utilizan para sustituir los intestinos delgados de ovino y porcino para la elaboración de salchichas crudas, secas o cocidas y de morcilla. Las tripas son muy finas y relativamente tiernas a la masticación.

Tripas no comestibles: Se adiciona un pequeño porcentaje de fibras de celulosa al colágeno para aumentar la resistencia mecánica de la tripa.

Estas tripas son de mayor calibre (de 50 a 120), son más gruesas para resistir las fuerzas mecánicas del embutido. Se utilizan para reemplazar las tripas de bovino. Pueden ser ingeridas sin miedo pero son resistentes a la masticación. En el caso de los productos de charcutería, la tripa de colágeno soporta bastante bien la disminución del calibre durante el secado del producto. La permeabilidad al vapor de agua es superior a la de una tripa natural. Los fabricantes prefieren usar este tipo de tripas para la elaboración de salame.

Tripas de celulosa

Están constituidas por celulosa regenerada y por un plastificante (generalmente glicerina). Hay tres fases principales en la fabricación de las tripas de celulosa.

- Preparación de la pasta viscosa
- Preparación de las fibras
- El afinado

Tripas a base de polímeros de síntesis.

Estas tripas elaboradas a partir de polímeros de síntesis (materias plásticas) son destinadas a embutidos de los productos de charcutería cocidos. Su característica principal es la impermeabilidad a los gases y al vapor de agua, a las grasas y a los microorganismos. Pueden estar fabricadas a partir de diferentes materias:

- Poliamidas
- Poliésteres
- PVDC

1.3 Cepas utilizadas en la producción de salame.

Entre los microorganismos utilizados en los fermentos en el salame se encuentran:

Lactobacilos: *L. sake, L. curvatus, L. Plantarum*, en los que las principales características son una fermentación rápida de las hexosas (homofermentación) aunque por el contrario relativamente lenta de los poliholósidos clásicos: lactosa, maltosa, glúcidos complejos (Klettner y List, 1980)

Pediococos: *P. acidilactici, P. pentosaceus* muy activos a temperatura elevada (35 – 40ºC) y homofermentativos.

Estafilococos denominados útiles como *Staphylococcus xylosus* capaces de fermentar la glucosa de forma relativamente lenta en ácido láctico y otros compuestos como la acetoína y el diacetilo

(Lucke y Hechelmann, 1987). Por otra parte, los estafilococos poseen esterasas susceptibles de formar etil-ésteres a partir del etanol y de los ácidos de cadenas cortas. (Talon, 1996). Las tablas 2 y 3 reproducen algunas características de microorganismos utilizados en los fermentos de los salmes.

TABLA 2.

PRINCIPALES PROPIEDADES DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS UTILIZADAS COMO FERMENTOS EN EL SALAME

	Lactobacilos			**Pediococos**	
Características	*L. plantarum*	*L. sake*	*L. curvatus*	*P. pentosaceus*	*P. acidilactici*
Forma	bastón	bastón	bastón curvado	cocos generalmente reunidos de 4 en 4	
Fermentación de:					
glucosa	+	+	+	+	+
sacarosa	+	+	+/-	+	+
lactosa	+	+	+/-	+	-
maltosa	+	-	+/-	+	-
ácido glucónico	+	+	-	-	-
almidón	-	-	-	-	-
D-ribosa	+	+	+	+	+
Producción de acetoína	+	+/-	+/-	+	+

FUENTE: Tecnología de los productos de charcutería y salazones.

Si bien todas estas especies microbianas son homofermentativas, su capacidad para fermentar los diferentes azúcares es variable.

TABLA 3.

PROPIEDADES DE LOS MICROCOCCACEAE UTILIZADAS COMO FERMENTOS EN LOS SALCHICHONES CURADOS, Y JAMON CURADO

	S. carnosus	***S. xylosus***	***M. varians***
Crecimiento anáerobio en presencia de glucosa	muy bajo	Bajo	bajo
Creciemiento aerobio en presencia de:			
glucosa	+	+	+
sacarosa	-	+	-
lactosa	buena	+	ligera
almidón	+	+	-
maltosa	-	+	-
producción de acetoína		+	+

FUENTE: Tecnología de los productos de charcutería y salazones

Estas tres especies microbianas se desarrollan difícilmente en anaerobiosis, aunque soportan bien la presencia de un 10% de sal

P/V. Todas ellas fermentan la glucosa. S. xylosus tiene el mayor espectro de azúcares fermentables.

1.4 Descripción de un probiótico y Alimento Funcional.

Las bacterias probióticas modifican favorablemente el balance de la microflora intestinal, inhiben el crecimiento de bacterias nocivas, favorecen una buena digestión, potencian la función inmunológica y aumentan la resistencia a las infecciones. Las personas con colonias intestinales florecientes de estas bacterias benéficas están mejor equipadas para combatir el crecimiento de las bacterias que causan enfermedades. Los lactobacilos y los bacilos bífidos mantienen un balance sano de la flora intestinal al producir compuestos orgánicos como el ácido láctico, agua oxigenada y ácido acético, que aumentan la acidez intestinal e inhiben el desarrollo de muchas bacterias nocivas. Las bacterias probióticas también producen unas sustancias llamadas bacteriocinas que funcionan como antibióticos naturales matando a los microorganismos no deseados.

Los efectos más destacables que se pueden resumir son: a) La mejora de la respuesta inmunitaria; b) el mantenimiento de la microbiota del colon, reduciendo la cantidad de diversas enzimas procarcinógenas en las heces; c) el tratamiento de la diarrea del viajero y la secundaria a la terapia antibiótica; d) el control de los rotavirus y de la colitis inducida por *Clostridium diffiicile;* y e) la prevención de las úlceras relacionadas con *Helicobacter pyroli*.

Clasificación:

En pocos años los probióticos han evolucionado desde productos pioneros como *Lactobacillus acidophillus*, hasta la gran variedad que existe actualmente con varios tipos de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium bifidum, Streptococcus thermophilus,* Enterococcus faecium.

La selección de una cepa como probiótico requiere que sus efectos fisiológicos beneficiosos sean demostrados científicamente que la cepa sea de origen humano y seguro para uso humano que sea estable al ácido y la bilis y que se adhiera a las células de la mucosa intestinal así como que también excluya o reduzca la presencia de patógenos y colabore en la formación de una flora normal equilibrada.

Entre los microorganismos comúnmente empleados como probióticos se encuentran las siguientes bacterias. Ver Anexo A.

Una característica de los microorganismos considerados probióticos es que son bacterias aisladas del tracto intestinal de un individuo saludable e introducido nuevamente en el intestino generalmente por medio de algún tipo de vehículo alimenticio. Ver Anexo B.

Mecanismos de Acción:

Diversas pruebas realizadas con animales han demostrado que las cepas probióticas ejercen una acción protectora contra la adherencia, la colonización, la reproducción y la acción patógena de agentes entero patógenos específicos mediante distintos mecanismos de acción que aún no han sido completamente esclarecidos. No obstante, entre los mecanismos más significativos que se han propuesto destaca la privación a los agentes patógenos de los nutrientes específicos. Ver Anexo C.

Por otro lado, los probióticos producen numerosas sustancias antimicrobianas específicas como las bacteriocinas, ácidos grasos volátiles de cadena corta, peróxido de hidrogeno y ácido láctico *(Bifidobacterium, Lactobacillus, Streptococcus)* por lo que se reduce el pH; se considera el principal mecanismo por el cual las bacterias lácticas inhiben el crecimiento de diferentes bacterias patógenas como *E. coli, Streptococcus y Salmonella*.

Beneficios para la salud.

Al uso de probióticos se le atribuyen numerosos efectos saludables, y son muchos los trabajos que demuestran los beneficios de éstos para la salud humana.

TABLA 4.

PRINCIPALES MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS Y ALGUNOS DE SUS EFECTOS BENEFICIOSOS PARA LA SALUD.

Microorganismo	Efecto beneficioso
L. acidophilus LC1	Equilibrio flora intestinal, efecto en sistema inmunitario
L. acidophilus NCFCO1748	Reducción actividad enzimas procancerígenas y diarrea
L. acidophilus NCFM	Reducción actividad enzimas procancerígenas
L. jonsonii LA1	Inmunoestimulador, tratamiento de gastritis y úlceras
L. rhamnosus GG	Inmunoestimulador, diarrea, inflamación del intestino
L.bulgaricus	Inmunoestimulador, absorción de lactosa
L. casei	Promotor del crecimiento y de la viabilidad de probióticos
B. bifidum	Diarrea por rotavirus, equilibrio de la microbiota
S. thermophilus	Inmunoestimulador, absorción de lactosa
S. boulardii	Prevención de diarrea y tratamiento de colitis.

FUENTE: Probióticos, Departamento de microbiología Facultad de Medicina Universidad Complutense de Madrid.

Enfermedad inflamatoria intestinal.

Se han evaluado los beneficios de los probióticos en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal mediante estudios. Una formula constituida por especies *Bifidobacterium, Lactobacillus y S. thermophilus,* resultaron ser tan efectivas como el tratamiento estándar en la prevención de las recaídas en la colitis ulcerosa.

Intolerancia a la Lactosa

S. thermophilus, especie perteneciente al grupo de *Streptococcus salivarius,* se ha usado mayormente como probiótico por su capacidad de fermentar la lactosa. La aportación de lactasa a partir de cultivos bacterianos se basa en intentar mejorar la digestión de la lactosa en los pacientes con intolerancia a esta.

Efectos moduladores sobre el sistema inmunitario.

La influencia de los probióticos sobre la respuesta inmunitaria se empezó a investigar en los inicios de la pasada década. Se ha observado que ciertas cepas de bacterias ácido-lácticas intervienen sobre las reacciones de hipersensibilidad retardada y la producción de anticuerpos.

Varios grupos de investigadores han descrito las propiedades inmunomoduladoras de las bacterias ácido lácticas en humanos. Se probó en un grupo de voluntarios sanos una leche fermentada suplementada con *L. acidophilus* o *B. bifidum Bb12*, y se midió la actividad fagocítica de los leucocitos en sangre la cual se vio aumentada, ocurriendo paralelamente con la colonización fecal por bacterias ácido-lácticas que permanecieron en el intestino durante seis semanas tras la ingestión del producto. Los estudios más recientes aseguran que el mecanismo de fagocitosis se activa e incrementa en los tratamientos productos ernriquecidos con *Lactobacillus*, y que va acompañado de la producción de varias citocinas, como el interferón gamma, la interleucina 12 y la interleucina 10.

Alimento Funcional.

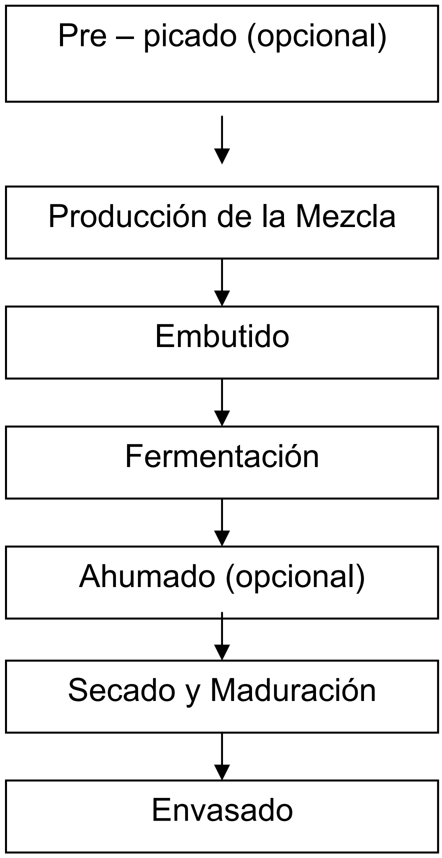
Un panel de expertos coordinado por el ILSI (International Life Sciences Institute), fue el primero en elaborar en 1999 un documento en consenso en el cual se definía lo que es un alimento funcional según este documento “alimento funcional es aquel que contiene un componente, nutriente o no nutriente, con efecto selectivo sobre una o varias funciones del organismo, con un efecto añadido por encima de su valor nutricional y cuyos efectos positivos justifican que pueda reivindicarse su carácter funcional o incluso saludable”.

Según esta definición serian alimentos funcionales todos aquellos alimentos naturales o modificados y enriquecidos con, ácidos grasos, vitaminas, minerales, sustancias antioxidantes, fibra,..que aportan efectos beneficiosos para la salud. Dentro de esta definición entrarían también los productos que contienen probióticos (bacterias vivas que proporcionan efectos beneficiosos para la salud) como el yogur, leches fermentadas, quesos y otros.

1.5 Descripción del Proceso de Producción.

En el diagrama de flujo muestra los pasos generales en la elaboración de salames. Los principales pasos se describirán con mayor detalle a continuación.

DIAGRAMA DE FULJO: Elaboración de Salame.



Producción de la mezcla.

Se pican las carnes en una maquinas picadora de carne o en el cutter, primero se incorpora la carne de vacuno congelada luego la de cerdo esto se hace a revoluciones lentas. Una vez que se alcance el tamaño del grano deseado se podrá agregar el tocino congelado. Una vez ya picada la carne se incorporan los ingredientes, la sal va al final.

Embutido.

Se debe eliminar el aire que pueda quedar dentro de la masa antes de embutir. Se puede pinchar la masa repetidas veces para que salga el aire dentro. Alimentar la embutidora con bolas de masa, esto también permite su eliminación. La importancia de eliminar el aire radica en que nos podrá causar problemas de descomposición bacteriana y de crecimiento de mohos o la formación de cámaras huecas dentro del embutido.

La presión de llenado debe ser correcta al igual que el diámetro del tubo de llenado debe acomodarse al calibre de las tripas.Se prefiere las tripas de colágeno, es importante que tengan una suficiente permeabilidad al agua y una buena capacidad de contracción. Ligar la tripa embutida con clips o bozal dando el tamaño que se desee comercializar.

Fermentación.

Una vez embutida la pasta el salame es sometido a un alza de la temperatura entre 22 y 26° C por un tiempo de 12 a 14 horas. El objetivo es que la curación sea rápida y mayor. La transformación de la pasta en salame y la conservación de este esta sujeto al éxito de fenómenos físico-químicos y microbiológicos que se producen por la acción de ciertos microorganismos presentes en la pasta, responsables de dar características deseables al producto.

Ahumado:

Este es un paso opcional, el producto puede o no ahumarse el proceso de ahumado tiende a ser más importante por sus propiedades de sabor más que por su efecto de conservación. El ahumado contiene compuestos que son perjudiciales para los microorganismos de la superficie. El tiempo de ahumado se basa principalmente en el desarrollo del sabor requerido. Sin embargo, la acumulación de carbonilos nocivos, ácidos, fenoles y en particular 3,4-benzopireno debe mantenerse lo más baja posible y por ende deben evitarse las elevadas temperaturas generadas por el ahumado de la madera timber (llama abierta).

Sala de maduración.

Una vez transcurrido el tiempo de fermentación, se trasladan los salames a la cámara o sala de maduración que debe tener una temperatura de 15 a 18° C y una humedad relativa de 80 a 85%. Es en estas condiciones donde el salame adquiere todas las características organolépticas que lo distinguen y lo transforman en un producto de alta calidad y gran aceptabilidad.

Envasado.

Una vez secados los embutidos se envasan en cajas de cartón o en bolsas de plásticos. En ocasiones se venden ya loncheados y envasados al vacío.

CAPITULO 2

2.PRUEBAS EXPERIMENTALES

Después de varias pruebas con salame la idea de usar este producto para obtener un snack cárnico con propiedades funcionales, fue considerada conveniente, ya que al realizar una prueba a nivel de laboratorio el snack tuvo características organolépticas aceptables.

Para mejorar las características en la prueba experimental, la idea de elaborar un snack cárnico con propiedades funcionales a base de bacterias probióticas fue tomado como inicio de la investigación para el diseño de este producto.

El snack cárnico a obtener debería ser aceptado, tomando como base de evaluación, características organolépticas y el crecimiento de bacterias probióticas, en este caso: *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus.*

Para empezar a elaborar las pruebas, se diseñó el experimento basado en la evaluación microbiológica (crecimiento de bacterias probióticas), de forma independiente para cada muestra. Para obtener el diseñó del experimento se analizó el posible crecimiento, basado en cambios de concentración de probiótico como por ejemplo 0.5 gr, 1gr y 2gr. /678gr.

Las tres primeras muestras se combinan de la siguiente forma: 0.13 gr. de cultivo F1 (*Pediococcus Pentosaceus y Pediococcus Acidalicti*) con 0.5, 1 y 2gr. de probiótico (*Lactobacillus Acidophilus y Streptococcus thermophilus)* respectivamente. Las siguientes tres muestras se combinan: 0.15gr. De cultivo LHP (*Pediococcus Pentosaceus y Staphylococcus xylosus*) con 0.5, 1 y 2 gr. de probiótico *(Lactobacillus Acidophilus y Streptococcus thermophilus),* respectivamente. Ver tabla 6.

Todas las pruebas presentarán la misma formula: carne de res, cerdo, tocino, sal, nitratos, nitritos, eritorbato, glucosa, etc.

2.1 Variables y Niveles para las pruebas experimentales

Los factores o variables a analizar son el cultivo fermentador, los cuales son dos tipos de cultivos y el probiótico que se encuentra en tres diferentes concentraciones como ya lo hemos nombrado. Estos factores se escogieron porque se busca evaluar el comportamiento de la mezcla de estas bacterias en el producto.

TABLA 5.

VARIABLES Y NIVELES

VARIABLES	**NIVELES**		
CULTIVOS	F1	LHP	
PROBIÓTICOS	0,5	1	2

FUENTE: Irina Torres, 2008.

Las combinaciones se las presenta en la siguiente tabla.

TABLA 6.

COMBINACIONES ENTRE VARIABLES Y NIVELES

# de muestras	**F1**	**LHP**	**Probióticos**
1	0.13 gr.		0,5 gr.
2	0.13 gr.		1 gr.
3	0.13 gr.		2 gr.
4		0.15 gr.	0,5 gr.
5		0.15 gr.	1 gr.
6		0.15 gr.	2 gr.

FUENTE: Irina Torres 2008

Con la ayuda del programa estadístico MINITAB, se diseñó la matriz de orden estándar para aleatorizar las pruebas y posteriormente analizar los principales factores e interacciones que influyen significativamente sobre la variable de respuesta. Cabe aclarar que para realizar la matriz de orden estándar en el diseño de experimentos, las pruebas serán numeradas del 1 al 6.

En la realización del diseño se utilizará la codificación +1 para los niveles altos y -1 para los niveles bajos de cada variable.

Variable de Respuesta:

Es el resultado que se busca evaluar si está influenciado por los factores escogidos, en este caso es la cantidad de bacterias probióticas que han crecido, siendo la dosis usual $1x10^9$ – $1x10^{10}$ UFC al día de *Lactobacillus acidophilus* se considera la cantidad mínima para mantener una microflora intestinal sana. En cuanto al *Streptococcus thermophilus* no se ha encontrado una dosis exacta como la que se muestra en el caso del *Lactobacillus*, pero si este esta presente nos ayuda. Además se ve que de acuerdo a las pruebas de laboratorio esta presente en concentraciones significativas.

TABLA 7.

MATRIZ DE ORDEN ESTÁNDAR

Order	Run	C	P	VR1 (UFC/gr)	VR2 (NMP/gr)	RESI1	RESI2
5	1	LHP	1	1E+07	1E+05	-485333333	62350
3	2	F1	2	3E+09	9100	4833333	27200
4	3	LHP	0,5	1E+05	24000	485333333	-62350
1	4	F1	0,5	4E+06	210000	-4833333	-27200
6	5	LHP	2	2E+09	2200	490166667	-35150
2	6	F1	1	2E+09	91000	-490166667	35150

VR1 = Lactobacillus acidophilus, (UFC/g)

VR2 = Streptococcus thermophilus, (NMP/g)

Uno de los requisitos en el diseño de experimento es que cumpla con la normalidad para lo cual se realiza el gráfico Probability Plot, y se establecen las siguientes hipótesis:

Ho: El experimento sigue la normalidad

H1: El experimento no sigue la normalidad

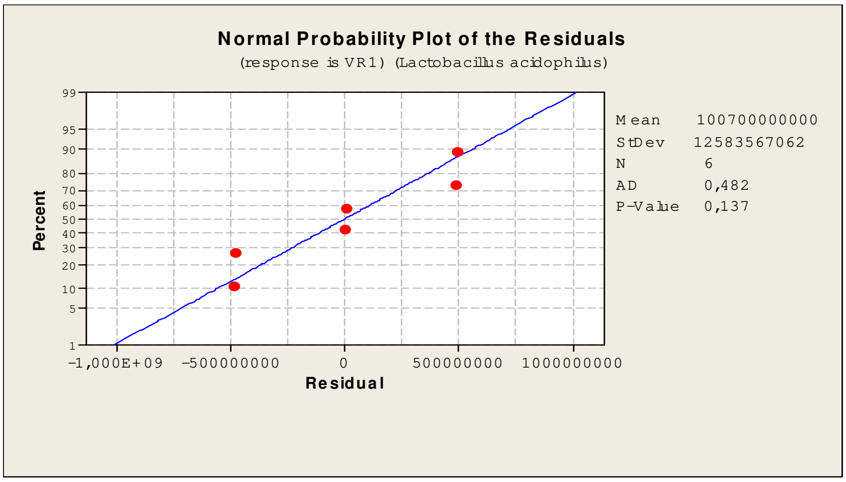


FIGURA 2.1: Probability Plot de Normalidad

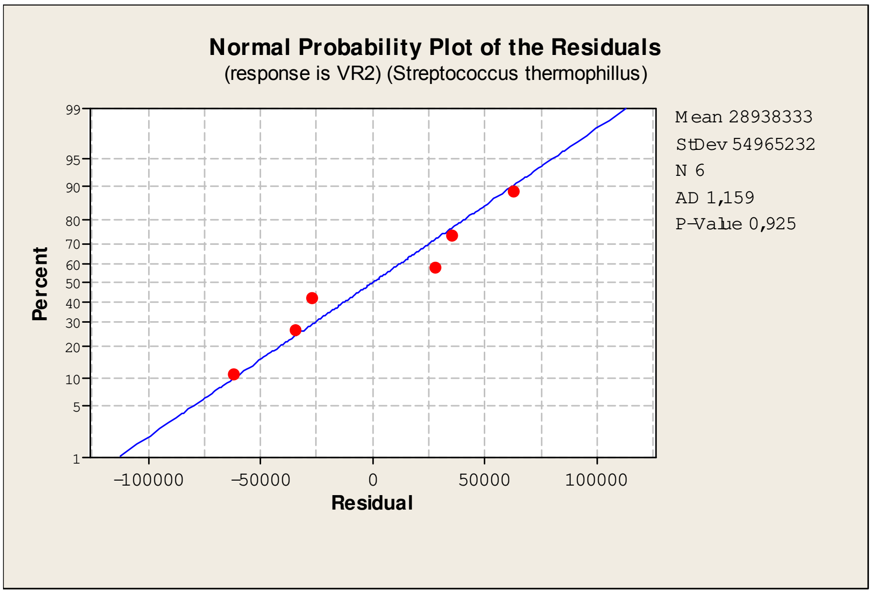


FIGURA 2.2: Probability Plot de Normalidad

Si se cumple con la siguiente condición que el p-value es menor que el alpha entonces se rechaza Ho, por medio de la figura 2.1 y 2.2 se muestra un p-value de 0.137 y 0.925 con un alpha de 0.05, por lo tanto el p-value es mayor que el alpha y se acepta Ho lo que indica que el experimento si sigue una distribución normal.

2.2 Análisis del Diseño del experimento para las pruebas experimentales

La matriz de orden estándar nos da la aleatoriedad en que debemos hacer las 6 pruebas. Después, a partir del diseño de experimentos pudimos obtener datos del MINITAB que vamos a analizar.

Las hipótesis para este modelo son:

1) Ho: C = 0 2) Ho: P = 0

H1: C ≠ 0 H1: P ≠ 0

Donde C = Cultivo, P= probiótico.

Ho = 0 significa que el factor no tiene efecto sobre la variable de respuesta. Para evaluar el efecto que produce cada factor sobre la variable respuesta se analiza el P value obtenido del **Factorial Fit** y se determina el criterio de decisión: Si Pv es menor que (α=0.05) se rechaza Ho.

TABLA 8.

FACTORIAL FIT: VR1 VERSUS CULTIVO, PROBIÓTICO

Term	Coef	SECoef	T	Pv
Constant	4800000000	23171349260	2,11	**0.000**
Cultivo	33900166	56900183	2,40	0,042
Probiótico	91971429	85099568	2,84	0,036

TABLA 9.

FACTORIAL FIT: VR2 VERSUS CULTIVO, PROBIÓTICO

Term	Coef	SECoef	T	P
Constant	2478920	6987450	0.38	**0.00**
Cultivo	3270900	9732060	0,34	0,040
Probiótico	15828350	10154940	1,56	0,026

Como se puede observar en la tabla 8 y 9 el P value es menor que (α = 0.05) en el caso del cultivo y probiótico, por lo tanto rechazo Ho

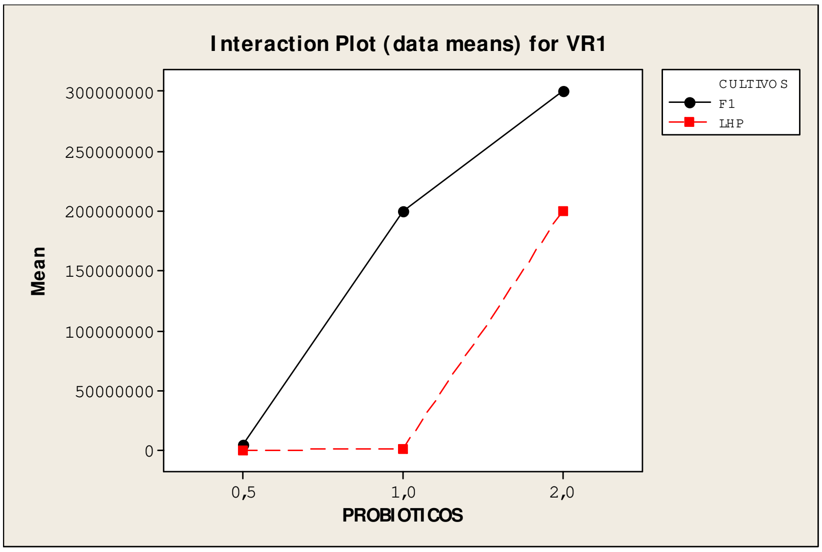


Figura 2.3. Comportamiento de los cultivos con respeto al crecimiento probiótico.

Este gráfico nos indica que las muestras 2, 3 y 6 son las más significativas. La dos y tres corresponden al cultivo F1 con concentraciones de 1 y 2 gr de probióticos en las cuales tenemos un crecimiento de dos mil y tres mil millones de ufc/gr ($2x10^9$ y $3x10^9$ UFC/g) de *Lactobacillus acidophilus*. La muestra 6 corresponde al cultivo LHP con 2 gr. de probiótico, en esta tenemos un crecimiento de dos mil millones de ufc/gr ($2x10^9$UFC/g) de *Lactobacillus acidophilus*.

Como ya habíamos dicho de acuerdo a estudios clínicos realizados para mantener una flora intestinal sana la cantidad mínima de

Lactobacillus acidophilus que se debe consumir diariamente es de $1x10^9$ a $1x10^{10}$ UFC por ración.

De acuerdo al análisis microbiológico realizado, nuestro producto se considera un alimento funcional ya que las dosis requeridas de bacterias probióticas se encuentran presentes en el snack cárnico.

Entonces podemos decir que si empacamos 40 gr de snack cárnico, tenemos:

Cálculo de la cantidad de probiótico presente en 40 gramos de snack, usando cultivo fermentador F1 + 0.5, 1 y 2gr de Probiótico.

Muestra 1.

1gr. Snack cárnico ---→ $4x10^6$ UFC. L. acidophilus

40gr.Snack cárnico---→1.6x10^8 UFC. L. acidophilus.

Muestra 2.

1gr. Snack cárnico ---→ $2x10^9$ UFC. L. acidophilus

40gr.Snack cárnico---→8.x10^{10} UFC. L. acidophilus

Muestra 3.

1gr. Snack cárnico ---→ $3x10^9$ UFC. L. acidophilus

40gr.Snack cárnico---→1.2x10^{11} UFC. L. acidophilus

Cálculo de la cantidad de probiótico presente en 40 gramos de snack, usando cultivo fermentador LHP + 0.5, 1 y 2gr de Probiótico.

Muestra 4.

1gr. Snack cárnico ---→ $1x10^5$ UFC. L. acidophilus

40gr.Snack cárnico---→$4x10^6$ UFC. L. acidophilus

Muestra 5.

1gr. Snack cárnico ---→ $1x10^7$ UFC. L. acidophilus

40gr.Snack cárnico---→$4x10^8$ UFC. L. acidophilus

Muestra 6.

1gr. Snack cárnico ---→ $2x10^9$ UFC. L. acidophilus

40gr.Snack cárnico---→$8x10^{10}$ UFC. L. acidophilus

Análisis.

Dosis de referencia: ($1x10^9$ – $1x10^{10}$ UFC) de *Lactobacillus Acidophilus*, cantidad mínima para mantener una flora intestinal sana. De acuerdo al análisis microbiológico, la muestra 2, 3 y 6 empacadas en fundas de 40 gramos, cumplen con la dosis requerida de bacterias probióticas presentes en el alimento.

Para que las muestras 1, 4 y 5 cumplan con las dosis de bacterias probióticas requeridas, tendrían que ser empacadas en cantidades de 1000, 10000 y 100 gramos respectivamente, lo cual nos indica que es un peso elevado teniendo en cuenta que nuestro producto es un snack.

2.3 Formulación.

La elaboración de salame, presenta una fórmula base. Añadir otros condimentos puede mejorar sus características organolépticas, por ejemplo el uso de pimienta negra, pimentón, romero, etc. El uso de acidulantes químicos tales como la gluco-delta-lactona (Gdl) o ácido cítrico encapsulado son frecuentemente utilizados en remplazo de bacterias ácido lácticas y azúcares, se utiliza 0.8% de Gdl.La fórmula a usar es la básica, la cual será modificada por los resultados obtenidos en las pruebas experimentales.

TABLA 10.
FORMULACIÓN PARA SALAME FERMENTADO.

Materia Prima	Cantidad en Kg.
Vacuno	40
Cerdo	40
Tocino	20
Sal	2.2
Nitrato	0.04
Nitrito	0.02
Eritorbato	0.05
Fosfato	0.3
Condimento	0.7
Pimienta	0.01
Proteína vegetal	2
Dextrosa	1
Cultivos	X

FUENTE: Ing. Patricio Cáceres C, Procesamiento de carnes, 2006

Tomando como modelo la formulación base de salame fermentado, se elaboró las primeras pruebas a nivel de planta piloto porque se desea obtener una formula para snack cárnico con color, sabor, olor, textura aceptables.

A continuación se presenta la formula base que se uso para las seis pruebas.

TABLA 11.

FORMULA BASE PARA SNACK CÁRNICO.

Ingredientes	**Peso en (gr.)**	**Porcentaje (%)**
Vacuno (90/10)	1500	36.87
Cerdo (90/10)	1500	36.87
Tocino congelado	900	22.12
Total	**3900**	
Sal	85.8	2.1
Nitrato	1,56	0,038
Nitrito	0,78	0,019
Eritorbato	1,95	0,048
Fosfato	11.7	0,29
Sabor a salame	27,3	0,67
Glucosa	39	0.96

FUENTE: Irina Torres R, 2008

Es importante mencionar, de acuerdo a las recomendaciones dadas en la ficha técnica del vendedor se determina la dosis a utilizar de cultivo en las pruebas.

Cultivo LHP: (*Pediococcus acidilactici, Pediococcus pentosaceus)*,

225 Kg., $\longrightarrow$ 50 gr., de cultivo.

Cultivo F1 (*Pediococcus pentosaceus, Staphylococcus* xylosus).

225 kg., $\longrightarrow$ 42 gr., de cultivo.

En cuanto al probiótico, no existen fichas técnicas o una norma donde nos indique una concentración máxima o mínima. Por esto decidimos analizar tres tipos de concentración 0,5, 1 y 2 gr. y de acuerdo a esta dosis, analizamos las UFC/gr. o NMP/g de bacterias probióticas que han crecido.

TABLA 12.

PRUEBAS A NIVEL DE PLANTA PILOTO.

Formula base, 4068gr. de masa total, 678 gr. para cada prueba:	
Prueba #1	0.13 gr F1 + 0.5 gr. probiótico
Prueba #2	0.13 gr F1 + 1 gr. probiótico
Prueba #3	0.13 gr F1 + 2 gr. probiótico
Prueba #4	0.15 gr. LHP +0.5 gr. probiótico
Prueba #5	0.15 gr. LHP + 1 gr. probiótico
Prueba #6	0.15 gr. LHP + 2 gr. probiótico

FUENTE: Irina Torres R, 2008.

Como se muestra en la tabla 12 en cada prueba se uso 678gr.

De acuerdo al diseño de experimento este nos muestra que los dos tipos de factores (cultivo y probiótico) influyen en la variable de respuesta (crecimiento de bacterias probióticas), de nuestro diseño.

Además nos indica que muestra sería la más apropiada para nuestro estudio. Como ya habíamos observado en la grafica 2.4 las muestras que contienen cultivo F1, tienen mayor crecimiento de bacterias probióticas. De acuerdo al crecimiento y la concentración este nos indica que la muestra que contiene el cultivo F1 + 1gr. de probiótico logra el crecimiento o la dosis recomendada por los estudios, esta iría en nuestra formula final.

A continuación se presenta la formula final de acuerdo al diseño de experimento.

TABLA 13.

FORMULA FINAL

Materia prima	Peso
Cerdo (90/10)	1,500
Vacuno (90/10)	1,500
grasa de cerdo (lomo tocino)	0,900
Glucosa	0,0390
Sabor a salame	0,0273
Eritorbato	0,00195
Tripolifosfato	0,01170
Sal	0,0858
50% nitrato y 50% nitrito	0.00234
Total crudo	4,068
Merma esperada (%)	35,0%
Total terminado	2,644
Cultivo F1	0,00013
Probiótico	0.001

FUENTE: Irina Torres R, 2008

2.4 Caracterización:

2.4.1 Materia Prima.

La materia prima será recibida con las siguientes características:

Magros:

Carne de res: Existen diferentes tipos de carnes, ejemplo: ácidas, normales, DFD (oscuras, firmes y secas), PSE (pálidas, blandas, exudativas). El tipo de carne que necesitamos es del tipo Normal, no siendo aceptables ninguna de las anteriores mencionadas. Ver Anexo D y E

Carne de cerdo: La carne de cerdo puede ser de macho o de hembra, con exclusión de los animales reproductores, que ha finalizado su periodo de cebo, o macho sin castrar.

TABLA 14.

CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA CÁRNICA

CARACTERISTICA	NIVEL
Temperatura	0 - 1ºC
pH	5,6 - 6,0
Color	Normal
Olor	Característico
Grasa	10%

FUENTE: Paule Durand, Tecnológia de los productos de charcutería y salazón

Tocino o grasa dorsal: La grasa dorsal se sitúa entre el lomo y la piel

Temperatura de recepción: -5 a 0ºC.

Cultivos Fermentadores:

Los cultivos recomendados por los expertos para desarrollar nuestro snack cárnico son:

F1 (cultivo cárnico).

Es un cultivo concentrado de una mezcla de *Pedioccoccus pentosaceus y staphylococcus xylosus.* De gran actividad especialmente recomendado para reducir el pH, desarrollar y estabilizar el color y sabor de nuestro producto, en los que se requiere una acidificación rápida, buena nitrificación, prevención del enranciamiento, alargamiento de la vida comercial.

Características:

Cultivo de *Pediococcus pentosaceus y Staphylococcus xylosus*, liofilizado que permite tener, en las condiciones de aplicación que recomiendan las fichas técnicas, una concentración en la amasada suficiente para dominar la flora ambiental, dirigir la fermentación y conseguir los efectos deseados.

Temperatura de Fermentación: 22 – 32ºC (70 – 90ºF).

Presentación, Almacenamiento y Caducidad.

El F1 se suministra en bolsas de aluminio termoselladas conteniendo 42 gr. Conserva toda su actividad durante 12 meses a -17ºC, o bien durante 3 meses a 4ºC.

Aspecto Físico:

Polvo liofilizado amarillento.

LHP: (cultivo cárnico).

Es un cultivo concentrado de una mezcla de *Pedioccoccus pentosaceus y pediococcus acidilactici.* De gran actividad especialmente recomendado para reducir el pH, desarrollar y estabilizar el color y sabor de nuestro producto, en los que se requiere una acidificación rápida, buena nitrificación, prevención del enranciamiento, alargamiento de la vida comercial.

Características:

Cultivo de *Pedioccoccus pentosaceus y pediococcus acidilactici,* liofilizado que permite tener en las condiciones de aplicación recomendad por las fichas técnicas del vendedor una concentración en la amasada suficiente para dominar la flora ambiental, dirigir la fermentación y conseguir los efectos deseados.

Temperatura de Fermentación: 26 – 38ºC (80 – 100ºF).

Presentación, Almacenamiento y Caducidad.

El cultivo LHP se suministra en bolsas de aluminio termoselladas conteniendo 50 gr. Conserva toda su actividad durante 12 meses a -18ºC.

Aspecto Físico:

Polvo liofilizado amarillento.

CULTIVO PROBIÓTICO:

Cultivo láctico termófilo, liofilizado, de una mezcla definida de cepas que contiene: *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobacteria y *Streptococcus salivarius* subesp. *Thermophilus.*

Datos Técnicos:

Número de células viables: 5×10^{10} ufc/g

Actividad: pH de 4.3 – 4.6 después de 6 horas de incubación a 40ºC.

Pureza:

Mohos y levaduras:	<10 ufc/g
Coliformes:	< 10 ufc/g
Staph. Aureus:	< 10 ufc/g
Salmonella:	negativo
Listeria:	negativo

2.4.2 Producto Terminado:

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS:

Temperatura:	Refrigeración 5-8 ºC
pH:	4.7 – 4.8
Humedad:	35%.

A continuación se presenta el análisis microbiológico que se realizo a cada una de las muestras.

Análisis # 1

Determinación de *E. coli.*

Medios y/o Reactivos.

- Agua de peptona.
- Placas Petrilfilm para E. coli.

Materiales y Equipos:

- Autoclave, 121ºC X15min
- Incubadora 35ºC +/- 1ºC.
- Balanza gramera
- Tijeras, pinzas
- Contador de colonias
- Aplicador de placas petrifilm para Coliformes / E. coli

- Pipetas 1 ml
- Probeta 250 ml
- Baño de maría
- pHmetro
- Mortero
- Mechero

Siembra:

- Se pesa 25 gr de muestra.
- Se tritura la muestra con la ayuda de de un mortero
- Se mide en una probeta 225 mililitros de agua de peptona y agregar a la muestra (10^1), (Solución madre).
- Homogenizar por un minuto.
- De la dilución 10^1 coger 1 mililitro y agregarlo a un tubo con 9ml tengo dilución 10^2
- Se hicieron tres diluciones.
- Se coloca a la placa petrifilm en una superficie plana, se levanta el film superior.
- Se rotula la placa.
- Con una pipeta, perpendicular a la placa petrifilm colocar 1 ml de muestra en el centro del film inferior.
- Bajar el film superior con cuidado evitando introducir burbujas de aire.

- Con la cara lisa hacia abajo, colocar el aplicador en el film superior sobre el inóculo.
- Con cuidado se ejerce presión sobre el aplicador para repartir el inóculo sobre el área circular.
- Con cuidado se levanta el aplicador, se espera 1 minuto a que solidifique el film.
- Se incuba las placas petrifilm cara arriba, a una temperatura de 35ºC +/- 1ºC por 48 horas.
- Se lee las placas petrifilm en un contador de colonias.

Las bacterias *E. coli* forman colonias azules asociadas con burbujas de gas.

Resultados:

TABLA 15.

RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS. DETERMINACIÓN DE *E. COLI*

Nº. de Muestras	Ensayos Realizados	Unidad	Resultados	Requisitos	Métodos/Ref
1	E. coli	UFC/g	< 10	$1,03x10^2$	AOAC 18th 991,14
2	E. coli	UFC/g	< 10	$1,03x10^2$	AOAC 18th 991,14
3	E. coli	UFC/g	< 10	$1,03x10^2$	AOAC 18th 991,14
4	E. coli	UFC/g	< 10	$1,03x10^2$	AOAC 18th 991,14
5	E. coli	UFC/g	< 10	$1,03x10^2$	AOAC 18th 991,14
6	E. coli	UFC/g	< 10	$1,03x10^2$	AOAC 18th 991,14

FUENTE: Irina Torres, 2008

Análisis # 2.

Determinación de *Salmonella.*

Reactivos:

- Caldo lactosa
- Caldo Selenito Cistina
- Caldo Tetrationato
- AGAR XLD
- AGAR HEKTOEN ENTERIC

- AGAR SULFITO BISMUTO.

Materiales y Equipos.

- Autoclave.
- Incubadora.
- Balanza gramera
- Aza de platino
- Pipetas estériles.
- Probeta 250 ml.
- Mortero
- Mechero
- Baño de maría

PROCEDIMIENTO:

- Pesar 25 gramos de muestra
- Adicionar 225 ml de caldo lactosa.
- Homogenizar por 2 minutos
- Incubar, solución madre por 48 horas a 35ºC

ENRIQUECIMIENTO:

Del enriquecimiento con caldo Lactosa, se sembró 1 ml. a un tubo que contenía 10 ml de Caldo selenito cistina

Incubar por 24 horas a 35ºC

Del enriquecimiento con caldo lactosa, se sembró a un tubo que contiene 10 ml. De caldo tetrationato

Incubar 24h00 a 35 ºC.

<u>AISLAMIENTO CON AGARES SELECTIVOS.</u>

De los dos medios de enriquecimiento, con aza de platino se sembró en los siguientes agares:

- Bismuto Sulfito agar (BSA), (48horas)
- Xilosa lisina desoxicolato agar (XLD), (24 horas)
- Hektoen agar (HEA), (24 horas).

Se incuba las placas de 24 ± 2 y 48 ± 2 horas a 35 ± 1ºC

<u>ASPECTO DE LAS COLONIAS TÍPICAS DE LAS *SALMONELLAS*</u>

AGAR XLD. – Colonias del mismo color que el medio de cultivo, transparentes a veces, con centro negro. Anaranjadas ligeramente opacas.

AGAR HEKTOEN. – Colonias, Verde- Azuladas, con o sin centro negro

AGAR SULFITO BISMUTO. –Colonias de color Marrón, gris, o negro, a veces con brillo metálico. El borde es generalmente marrón al principio, tornándose negro con el tiempo de aumento en la incubación.

Resultados:

TABLA 16.

DETERMINACIÓN DE *SALMONELLA* CUALITATIVA.

Nº. de Muestras	Ensayos Realizados	Unidad	Resultados	Requisitos	Métodos/Ref
1	Salmonella Cualitativa	Aus/Pres	Ausencia	Ausencia	AOAC 18th 967,26
2	Salmonella Cualitativa	Aus/Pres	Ausencia	Ausencia	AOAC 18th 967,26
3	Salmonella Cualitativa	Aus/Pres	Ausencia	Ausencia	AOAC 18th 967,26
4	Salmonella Cualitativa	Aus/Pres	Ausencia	Ausencia	AOAC 18th 967,26
5	Salmonella Cualitativa	Aus/Pres	Ausencia	Ausencia	AOAC 18th 967,26
6	Salmonella Cualitativa	Aus/Pres	Ausencia	Ausencia	AOAC 18th 967,26

FUENTE: Irina Torres, 2008

Análisis # 3.

Determinación de *Staphylococcus Aureus*

Reactivos:

- Agar Baird Parker
- Caldo BHI
- Agua de Peptona

Materiales y Equipos:

- Autoclave
- Incubadora
- Tijeras, pinzas
- Balanza gramera
- Pipetas estériles 1ml
- Probetas 250 ml
- Placas petri de vidrio
- Mortero
- Mechero
- Aza de platino

PROCEDIMIENTO:

- Se Pesa 25 gramos de muestra, adicionar 225 mililitros de agua de peptona y homogenizar por 1 minuto. (10^1).
- Se preparan tres diluciones
- Se adiciona 0.5 ml de cada dilución 10^1, 10^2, 10^3 a
- tubos que contiene caldo de soya.
- Se incuba a 35ºC por 48 horas.

Se leen cada uno de los tubos, si hay alguna precipitación.

ENRIQUECIMIENTO:

Con aza de platino se siembra por estría los tubos sospechosos en cajas petri, con agar Baird Parker

Se incuba 48 horas a 35 +/- 1ºC.

CARACTERISTICAS:

Las colonias son de ojo de pez redondo, con un precipitado alrededor y un alo.

Resultados:

TABLA 17

RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS. DETERMINACIÓN DE S. AUREUS.

Nº. de Muestras	Ensayos Realizados	Unidad	Resultados	Requisitos	Métodos/Ref
1	S. Aureus	NMP/g	<10	$1.0x10^2$	AOAC 18th 987,09
2	S. Aureus	NMP/g	<10	$1.0x10^2$	AOAC 18th 987,09
3	S. Aureus	NMP/g	<10	$1.0x10^2$	AOAC 18th 987,09
4	S. Aureus	NMP/g	<10	$1.0x10^2$	AOAC 18th 987,09
5	S. Aureus	NMP/g	<10	$1.0x10^2$	AOAC 18th 987,09
6	S. Aureus	NMP/g	<10	$1.0x10^2$	AOAC 18th 987,09

FUENTE: Irina Torres, 2008

Análisis # 4

Determinación de *Clostridium Perfrigens.*

Reactivos y medios de cultivo

- Agua de peptona
- Agar SPS (Sulfito- Polimixina- Sulfadiacina)

Materiales y Equipos:

- Autoclave
- Incubadora
- Tijeras, pinzas
- Balanza gramera
- Pipetas estériles 10ml
- Fiola de 500 ml.
- Probetas 250 ml
- Placas petri
- Mortero
- Mechero de alcohol
- Aza de platino
- Jarra de anaerobiosis

PROCEDIMIENTO:

- Se pesan 25 gr de muestra y se mezclan con 225ml de agua de peptona. (Solución madre). 10^{1}

- Se hacen 3 diluciones: 10^1, 10^2, 10^3.
- Se coge 1ml de cada dilución y se siembran en cajas petri con agar SPS.
- Las placas se las colocan en una jarra de anaerobiosis, en la jarra llevan un sobre de anaerobiosis y un indicador. Se incuba a 35ºC +/- 1ºC por 48 horas.

Las colonias de Clostridium son, colonias negras redondas.

Resultados:

TABLA 18

DETERMINACIÓN DE CLOSTRIDIUM PERFRIGENS.

Nº. de Muestras	Ensayos Realizados	Unidad	Resultados	Requisitos	Métodos /Ref
1	Clostridium Perfrigens	UFC/g	<10	$1.0x10^3$	AOAC 18th 976,30
2	Clostridium Perfrigens	UFC/g	<10	$1.0x10^3$	AOAC 18th 976,30
3	Clostridium Perfrigens	UFC/g	<10	$1.0x10^3$	AOAC 18th 976,30
4	Clostridium Perfrigens	UFC/g	<10	$1.0x10^3$	AOAC 18th 976,30
5	Clostridium Perfrigens	UFC/g	<10	$1.0x10^3$	AOAC 18th 976,30
6	Clostridium Perfrigens	UFC/g	<10	$1.0x10^3$	AOAC 18th 976,30

FUENTE: Irina Torres, 2008

A continuación se presenta una tabla global con los resultados microbiológicos realizados.

TABLA 19

RESULTADO MICROBIOLÓGICOS GLOBALES.

Ensayos Realizados	Unidad	Resultados	Requisitos	Método de ensayo
Clostridium Perfrigens	UFC/g	< 10	1.0×10^3	AOAC 18th 976,30
E. coli	UFC/g	< 10	1.0×10^2	AOAC 18th 991,14
S. Aureus	NMP/g	< 10	1.0×10^2	AOAC 18th 987,09
Salmonella Cualitativa	Aus/Pres	Ausencia	Ausencia	AOAC 18th 967,26

FUENTE: Irina Torres 2008

Las seis muestras analizadas SI cumplen con los requisitos microbiológicos para nuestro producto, tipo salame, de la norma INEN 1343

Después de haber concluido con nuestro análisis microbiológico patógeno, procedemos a analizar el crecimiento de bacterias probióticas en cada una de las muestras.

A continuación se presenta el procedimiento que se hizo en la determinación de Lactobacillus acidophilus y Streptococcus thermophilus.

DETERMINACIÓN DE LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS

Los lactobacilos son bacilos microaerófilos, gran positivos y catalasa negativos, estos organismos forman ácido láctico como producto principal de la fermentación de los azúcares.

Reactivos:

- Agar TSI
- Agua de Peptona

Composición del Agar TSI (Hierro tres azúcares)

• Extracto de carne	3.0 gr
• Extracto de levadura	3.0 gr
• Bacto peptona:	15.0 gr
• Proteasa peptona	5.0 gr
• Dextrosa	1.0 gr
• Lactosa	10.0 gr
• Sacarosa	10.0 gr.
• Sulfato ferroso	0.2 gr

• Cloruro Sódico	5.0 gr.
• Tiosulfato sódico	0.3 gr
• Bacto agar	12.0 gr
• Rojo de fenol	0.024 gr

Materiales y Equipos:

- Autoclave
- Incubadora
- Tubos estériles
- Balanza gramera
- Aza de platino
- Pipetas estériles 1ml.
- Probeta 100 ml.
- Mortero
- Mechero
- Baño de maría

Procedimiento:

- Se pesa 10 gr de muestra y se agregan a 90ml de agua de peptona. Solución madre (10^1).

FIGURA 2.4: Muestra de snack

Fuente: Irina Torres Ruilova, 2008

- Se realizan 10 diluciones.

FIGURA 2.5: Diluciones

Fuente: Irina Torres Ruilova, 2008

- Se siembra 1 ml de cada dilución en tubos inclinados con agar TSI, la siembra se la realiza con una asa de platino en la superficie inclinada por estriado y por picadura en la parte columnar. Se siembra por triplicado.

FIGURA 2.6. Tubos con agar TSI

Fuente: Irina Torres Ruilova, 2008

- Se incuban los tubos con las diluciones a 40ºC por 24 horas.
- Se leen los tubos que presentan crecimiento de colonias.

FIGURA 2.7: Tubos inclinados con agar TSI. En la identificación del crecimiento de colonias.

Fuente: Irina Torres Ruilova, 2008

Se analizan los tubos incubados y se lee lo siguiente:

Se observaron colonias pequeñas, opacas, redondas y lisas. También del tipo aplanadas, translucidas e irregulares. Características especificas del crecimiento de colonias de Lactobacillus acidophilus

Por seguridad se aplica el método de Tinsión de gram, para identificar con mayor seguridad, la presencia de esta bacteria.

<u>Método. Tinsión de Gram</u>

Reactivos:

- Solución de cristal violeta
- Solución de yodo
- Solución colorante de contraste

Procedimiento:

- Se seleccionan colonias con diferentes características, forma, tamaño, etc.
- Con una aza de platino se extiende la colonia en una placa de vidrio, usando un mechero se procede a la fijación.
- Se Tiñe la extensión con cristal violeta por 1 minuto
- Se lava la preparación

- Se cubre la preparación con solución de yodo hasta que se derrame, se mantiene por un minuto.
- Se lava con agua
- Se deja secar
- Se lava la preparación varias veces con alcohol etílico 95% hasta que deje de desprenderse el colorante.
- Se lava con agua
- Se coloca el colorante de contraste durante 10 segundos
- Se seca con papel filtro

Resultados:

La preparación se la lleva para ser observada por medio del microscopio.

Primero se observa que las colonias se tiñeron de azul, entones son grampositivos y se determina por la forma de bastones largos que son bacilos, entones son bacilos gram positivos bastante gruesos y de longitud variable, están aislados y cuando están en pares frecuentemente están algo flexionados en la unión y en empalizadas. También existen cadenas largas.

Con este análisis de confirmación podemos decir que si existe la presencia de Lactobacillus acidophilus en el snack cárnico.

TABLA 20. RESULTADOS.

CRECIMIENTO DE LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS

Nº, de muestra	Cultivo	Probiótico	Crecimiento Lactobacillus Acidophilus (UFC/g)
1	F1	0,5g.	**4,0x10^6**
2	F1	1g	**2,0X10^9**
3	F1	2g	**3,0X10^9**
4	LHP	0,5 g.	**1,0X10^5**
5	LHP	1g	**1,0X10^7**
6	LHP	2g	**2,0X10^9**

DETERMINACIÓN DE STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS

Reactivos:

- Caldo Azida Dextrosa
- Agua de Peptona

Medio selectivo para el crecimiento de bacterias de estreptococos es el caldo azida dextrosa.

Materiales y Equipos:

- Autoclave
- Incubadora
- Tubos estériles

- Balanza gramera
- Aza de platino
- Pipetas estériles 1ml.
- Probeta 250 ml.
- Mortero
- Mechero
- Baño de maría

Procedimiento:

- Se prepara 90 ml de agua de peptona
- Se pesa 10 gr de la muestra.
- Dilución 1-1: 10 ml de agua peptonada y 10g de snack cárnico
- Se hacen 10 diluciones
- Se coge 1ml de la dilución y se coloca en un tubo que contiene caldo azida dextrosa, (Se Hacen 3 diluciones).
- De esta forma se siembran todas las 10 diluciones, por triplicado.

FIGURA 2.8: Siembra en tubos con medio caldo azida dextrosa.

Fuente: Irina Torres Ruilova, 2008

- Se incuban los tubos a 35+/-1 ºC por 48 horas.

FIGURA 2.9: Lectura de tubos positivos

Fuente: Irina Torres Ruilova, 2008

<u>Caracterización</u>:

Es característico del Streptococcus thermophilus presentar un precipitado blanquecido y turbiedad del medio.

En el análisis se leen los tubos específicamente con las características de *Streptococcus thermophilus*.

TABLA 21. RESULTADOS. CRECIMIENTO DE STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS.

Nº, de muestra	Cultivo	Probiótico	Crecimiento Streptococcus Thermophilus (NMP/g)
1	F1	0,5g.	**2,1x10^4**
2	F1	1g	**9,1X10^3**
3	F1	2g	**9,1X10^2**
4	LHP	0,5 g.	**2,4X10^3**
5	LHP	1g	**1,4X10^5**
6	LHP	2g	**2,2X10^2**

Cabe recalcar que no existe una norma local donde nos indique un requisito máximo o mínimo en cuanto a la dosis en UFC/g o NMP/g. de bacterias probióticas.

Se encontró estudios clínicos donde indican que para tener una flora intestinal sana se debe ingerir diariamente $1x10^9$ – $1x10^{10}$ UFC/g de Lactobacillus acidophilus. En el caso de Streptococcus thermophilus no se han encontrado una norma o estudios donde nos indique la dosis máxima o mínima de esta bacteria. Pero si indican que con la sola presencia de ésta, ya está ayudando a la salud del consumidor. Algunas investigaciones hacen referencia, la combinación de estas dos bacterias han estado presentes en el tratamiento de enfermedades como: inflamación intestinal, prevención y tratamiento de la diarrea y para tener un efecto positivo en la microbiota intestinal.

<u>CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS</u>:

Sabor:	suavemente salado
Color:	Rojo intenso de la carne
Olor:	Característico a salame
Textura:	Consistencia sólida, blanda al corte
Tamaño:	3 cm de largo y 1.5 cm de diámetro.

<u>Análisis Nutricional:</u>

A nivel de laboratorio, se realizaron análisis de proteínas, grasa, humedad, nitritos y carbohidratos, los porcentajes se los presenta en la siguiente tabla.

TABLA 22.

ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO.

Ensayos Realizados	**Unidad**	**Resultados**	**Requisitos**	**Métodos/Ref e**
Grasa Total	%	37,23	Max. 45	AOAC 18th 960.39
Humedad	%	25,86	Max. 40	AOAC 18th 950.46 B
Nitritos	Pos/Neg	Positivo	Pos/Neg	Norma sanitaria panamericana
Proteínas	%	30,35	Min: 14	AOAC 18th 920.87
Carbohidratos	%	2	------	--------

Fuente: Laboratorios de microbiología protal, 2008

Las muestras analizadas SI cumplen con los requisitos bromatológicos, según al norman INEN 1343.

TABLA 23

INFORMACION NUTRICIONAL DEL SNACK CÁRNICO

INFORMACION NUTRICIONAL.

Tamaño por porción:	40 gr
Porciones por funda: aprox.	9 unidades
Proteínas	12.14 gr
Grasa Total	14.9 gr
Carbohidratos	1 gr
Energía	187 Kcal

Fuente: Irina Torres Ruilova, 2008

A continuación se presenta el cálculo de Kilocalorías para los 40 gramos de snack cárnico.

TABLA 24.

KILOCALORÍAS GENERADAS POR LOS NUTRIENTES ENERGÉTICOS

Nutrientes	Kilocalorías por gramo
Grasas	9
Proteínas	4
Azucares	4

FUENTE: Daniel Núñez, 2006

<u>Cálculo de calorías.</u>

Proteínas: 12.14 gr * 4 = 48.56 Kcal

Grasa: 14.9 gr * 9 = 134.10 Kcal

Carbohidratos: 1*4 = 4.0 Kcal

Total = 187 Kcal por 40 gramos.

<u>Presentación</u>:

Nuestro producto estará empacado en fundas plásticas con peso de 40 gr.

2.5 Pruebas de Aceptabilidad

Comparación de pares:

Se ha tomado 50 panelistas, presentando los 2 tipos de muestras en 2 platos diferentes, de color blanco.

FIGURA: 2.10. Pruebas sensoriales.

FUENTE: Irina Torres Ruilova, 2008

FIGURA: 2.11. Panelistas en la degustación de snack cárnico.

FUENTE: Irina Torres Ruilova, 2008

El texto utilizado para cada panelista es el siguiente:

Producto:…………………….. Fecha:……………………….

Pruebe las dos muestras codificadas en el siguiente orden: 6224 3500.

Cuál muestra usted prefiere: ____________

Comentarios: ____

Muchas gracias….

Suma total: 60 pruebas.

Resultados: 31 prefieren la muestra 6224.

Para la interpretación del resultado sólo es necesario consultar la tabla que aparece en el ANEXO 1. En esta se localiza el número de jueces que intervinieron en la prueba y entonces se encuentra en la columna que dice “prueba de 2 colas” el número mínimo de respuestas coincidentes para que haya respuesta significativa. Se escoge un nivel de significancia del 5%.El valor encontrado en la tabla indica cuántos jueces deben haber preferido la muestra para que en realidad haya preferencia significativa.

En nuestro análisis no existe diferencia ya que se necesitan 39 respuestas positivas para establecer alguna preferencia con significancia 5%

La muestra 3500 es aceptada de igual manera que el salame ya presente en el mercado.

2.6 Pruebas de Estabilidad:

Para realizar las pruebas de estabilidad se empaco el producto al vacío y en atmosferas modificadas usando 10%O_2, 30%CO_2 y N_2.

Figura 2.12: Producto empacado, en atmosferas modificada y al vacío.

FUENTE: Irina Torres Ruilova, 2008

Empaque al vacío:

El empacado al vacío como su nombre lo dice es el sistema por medio del cual se procura generar un campo de vacío alrededor de un producto y mantenerlo dentro de un empaque.

Uno de los sistemas más exitosos para la conservación de alimentos, ha sido el empacado al vacío porque al retirar el aire del contenedor, se obtiene una vida útil mas larga al poder conservar las características organolépticas ya que al eliminar el oxigeno no existe crecimiento de gérmenes aeróbicos, psicrofilos, y mesófilos que son los que originan la rancidez, la decoloración, y la descomposición de los alimentos.

Análisis Microbiológico:

Al producto empacado al vacío se le realizan pruebas microbiológicas para determinar crecimiento de bacterias anaerobias como *Clostridium* y al producto empacado en atmosferas modificadas determinación de mohos y levaduras, además también se realiza el análisis organoléptico.

A la muestra F1 + 1 gr. de probiótico se empaco al vacio el día 5 de Agosto del 2008, y se la mantuvo a temperatura entre 5-8 ºC. Después de 16 días se hizo el primer Análisis de *Clostridium Perfrigens* y el segundo análisis se lo hizo después de 14 días, en cada una de esta fechas también se hacían análisis en cuanto al color, olor, sabor, textura del snack.

Determinación de *Clostridium Perfrigens:*

Se pesaron 10 gr de muestra en 90 ml de agua peptonada.

Dilución 1- 1:10 ml de agua de peptona y 10 gr de la muestra.

Se coloca 1ml de cada dilución en cajas petri con agar específico para Clostridium.

Utilización de jarras de anaerobios, se colocan las cajas petri en la jarra, se coloca un sobre de Anaerogen, (reduce el nivel de oxigeno por debajo del 1%) y un indicador anaeróbico, este indica al un cambio de color rosa a blanco condiciones de oxido-reducción adecuadas.

Se incuba a 37 ºC por 48 horas.

Se procedió a ver resultados y el número de colonias que habían crecido fue 0.

De igual forma se volvió hacer la misma prueba el 04/09/2008. Y no hubo crecimiento de *Clostridium Perfrigens.*

TABLA 25.
EVALUACIÓN DE ESTABILIDAD MUESTRA F1+1gr. PROBIOTICO EMPACADA AL VACÍO

	FECHA DE EVALUACIÓN		
PARAMETRO	**05/08/2008**	**21/08/2008**	**04/09/2008**
pH	4,8	4,8	4,9
Clostridium Perfrigens	<10 UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g
Color	Rojo intenso	Rojo intenso	Rojo intenso
Olor	Característico	Característico	Característico
Sabor	Suavemente salado	Suavemente salado	Suavemente salado
Textura	Consistencia sólida blanda al corte	Consistencia sólida blanda al corte	Consistencia sólida blanda al corte
Apariencia del producto empacado	*10	*10	*10

FUENTE: Irina Torres R, 2008

* Quiere decir que el producto empacado al vacío tiene una presentación muy agradable durante todo el periodo de análisis.

Empaque en Atmósferas Modificadas:

Es el método de envasado de alimentos donde se sustituye el aire que rodea al producto, por un gas o una mezcla de gases que ofrece mejores condiciones para el mantenimiento de la calidad física y microbiológica del producto por mayor tiempo.

Análisis Microbiológico:

A la muestra seleccionada (F1+1gr. probiótico) se hicieron análisis de levaduras y mohos. Se leen resultados y no hay crecimiento.

TABLA 26.
EVALUACIÓN DE ESTABILIDAD MUESTRA F1+1gr.PROBIÓTICO, EMPACADO EN ATMOSFERAS MODIFICADAS.

PARAMETRO	FECHA DE EVALUACIÓN		
	05/08/2008	21/08/2008	04/09/2008
pH	4,8	4,8	4,9
Levaduras y mohos	<10 UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g
Color	Rojo intenso	Rojo intenso	Rojo intenso
Olor	Característico	Característico	Característico
Sabor	Suavemente salado	Suavemente salado	Suavemente salado
Textura	Consistencia sólida blanda al corte	Consistencia sólida blanda al corte	Consistencia sólida blanda al corte
Presentación del producto	+9	+7	+5

empacado			

FUENTE: Irina Torres R, 2008

+ Quiere decir que el producto empacado en atmosferas modificadas, no tiene presentación agradable, ya que el producto esta empacado en fundas plásticas transparentes, y no se lo puede apreciar.

De acuerdo a este análisis microbiológico y sensorial, el snack cárnico es estable.

TABLA 27. COSTOS DE MATERIA PRIMA PARA LA FABRICACIÓN DE SNACK CÁRNICO.

MATERIA PRIMA	CANTIDAD	COSTOS ($)	CANTIDAD REQUERIDA (Kg)	COSTOS ($)
VACUNO	1 Kg	4,95	1,5	7,425
CERDO	1 Kg	5,06	1,5	7,59
TOCINO	1 Kg	2,51	0,9	2,25
SAL	1 Kg	1	0,086	0,086
GLUCOSA	1 Kg	1,75	0,039	0,069
NITRATOS	1 Kg	1,4	0,00234	0,0033
NITRITOS	1 Kg	1,3	0,00234	0,003
POLIFOSFATOS	1 Kg	2,73	0,012	0,033
CONDIMENTO	1 Litro	6	0,0273	0,16
CULTIVOS FERMENTADORES	1 sobre	8,96	0,0007	0,0063
CULTIVOS PROBIOTICOS	1 sobre	16,57	0,001	0,017
TOTAL			**4,07068 Kg**	**$17,64**

Desperdicio	1%	4.037 Kg
Merma	35%	2.6442 Kg
COSTO TOTAL	aprox. 66 fundas de snack	$17,64
COSTO DEL PRODUCTO POR UNIDAD	1 FUNDA (40 gr)	$0,2673
UTILIDAD	35%	$0,094
PRECIO DE VENTA		$0,36

Fuente: Irina Torres Ruilova. 2008

CAPITULO 3

3 DISEÑO DEL PROCESO.

3.1 Descripción del Proceso.

Recepción de la materia prima:

Las materias primas deben ser de la mejor calidad. Y deben provenir de mataderos autorizados. No se usan carnes con daños físicos o con evidente proceso de descomposición.

El tipo de carne que se escoge es del tipo normal con 10 % de grasa con un pH comprendido entre 5.6 – 6.0, 24 horas después del sacrificio, presentan todas las cualidades tecnológicas buena capacidad emulsificante, color homogéneo y buena estabilidad microbiológica.

La grasa o tejido adiposo no debe ser blanda, para evitar que se derrita, por eso se escoge grasas duras como el tocino.

Temperatura de recepción: 0 – 1ºC.

Preparación de la carne y el tocino

Primero se congela la carne y el tocino con un mínimo de 12 horas previo al proceso, la carne deberá alcanzar temperaturas entre -3 y 0ºC. Es importante mantener baja la temperatura de proceso para evitar derretimiento de la grasa y alteración de las proteínas cárnicas, necesarias para la formación de la masa.

Producción de la mezcla:

La carne y la grasa son pre – picadas y luego son agregadas en el plato del cutter, al inicio del picado se agregan poco a poco los ingredientes como el condimento, cultivo, probiótico, nitrato, nitrito, glucosa. La sal y el tocino (pre-picado), aún congelado se agregan al final de esta operación. El último agregado de sal previene una extracción demasiado elevada de proteínas solubles de la carne que de lo contrario realzarían las propiedades de fijación del agua de la mezcla y luego impediría el proceso de secado. La última adición de grasa asegura que se mantenga una clara diferenciación entre las partículas de grasa y de carne. La temperatura de la carne durante toda la operación no debe exceder los (0 y 2ºC).

Embutido:

La masa es embutida en tripas sintéticas de 1.5 cm de diámetro se liga ya embutida con piolas dando un tamaño de 3 cm por cada snack. Durante el embutido es importante mantener una baja temperatura en la mezcla ya que esto evita el manchado. Un marcado manchado en el interior de la tripa del embutido impediría el secado de nuestro producto.

Luego del embutido es colgado a temperatura ambiente (28-30ºC)por 24 horas, esto permite equilibrar la temperatura.

.

FIGURA 3.1 snack embutido.

Fuente: Irina Torres Ruilova, 2008

Fermentación:

El paso de la fermentación abarca el período en la producción del snack cárnico donde el pH alcanza su nivel más bajo. El tiempo de fermentación del producto fue de 20 y 22 horas con temperatura entre 28 y 30ºC. Para obtener una óptima acidificación tuvimos muy en cuenta los siguientes factores:

- pH inicial: 6.
- Temperatura: 28- 30 ºC.
- Concentración de sal y actividad de agua: 2.2 % y 90-95%
- Azúcar fermentable: Glucosa
- Cultivos de bacterias ácido láctica: F1 *(pediococcus pentosaceus* y *staphylococcus xylosus*) y LHP (*pediococcus pentosaceus y pediococcus acidilactici*).
- Nivel de inoculación: 0.7 gr de F1 y 0.9 gr de LHP. Según fichas técnicas de vendedor.
- Diámetro del embutido: 1.5cm
- Nitrato y nitrito: 0.04% y 0.02%

A continuación se presenta un gráfico mostrando la influencia de la temperatura de fermentación (28-30ºC) en el pH y la disminución inducida por el cultivo de fermentación F1 y LHP. La mezcla del embutido contiene 1% de glucosa.

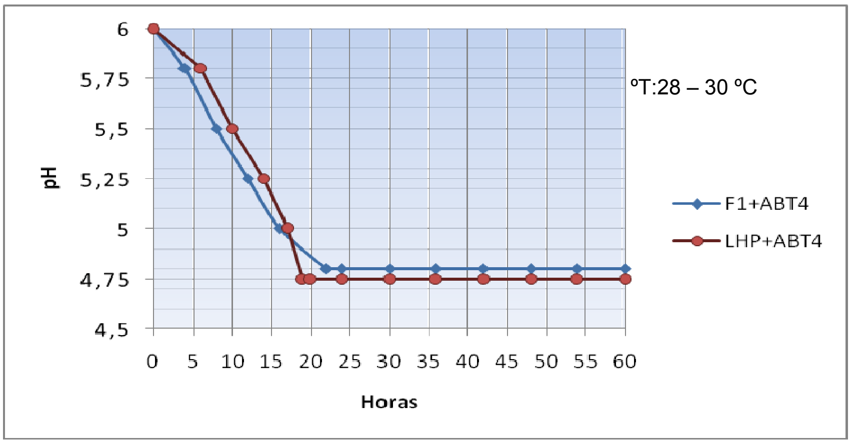


FIGURA: 3.2 Descenso de pH.

FUENTE: Irina Torres R, 2008

Secado y Maduración:

El paso del secado es definido como el período que va desde el final del ciclo de la fermentación hasta el punto donde el embutido ha logrado la pérdida de peso y actividad de agua deseada para la estabilidad microbiana y se ha obtenido la madurez deseada. La textura y firmeza correctas del snack cárnico seco – fermentado-madurado se completan durante el paso del secado debido a la eliminación del agua y la desnaturalización de las proteínas. Para lograr un secado uniforme es importante que la velocidad de evaporación del agua de la superficie del embutido no exceda la velocidad de migración de humedad del interior. De lo contrario nuestro snack podría presentar dureza en la superficie y un borde seco y puede resultar una obstrucción en la dispersión del agua del interior del embutido. También podrían verse afectados el sabor y el aspecto.

El secado que está acompañado de la maduración, afecta a las propiedades organolépticas del snack, impartiendo un aroma y sabor característico.

TABLA 18.

TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN - SECADO

Nº. Día	ºT	H.R.A
0	28	95
1	28	95
2	18	95
3	18	92
4	18	92
5	14	90
6	14	90
7	14	90
8	12	90
9	12	88
11	12	88
12	8	88
13	8	88
14	8	88
15	8	88
16	8	88
17	8	88

FIGURA 3.3 Día 0

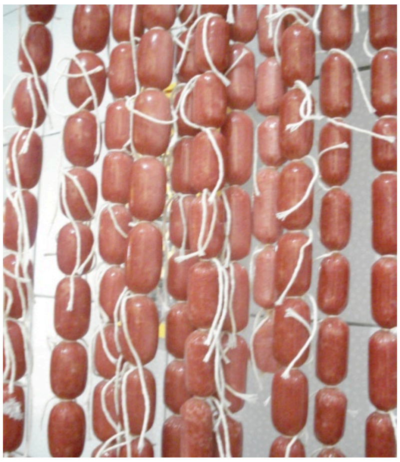


FIGURA 3.4 Día1

Figura 3.5 Día 2

Figura 3.6   Día 3

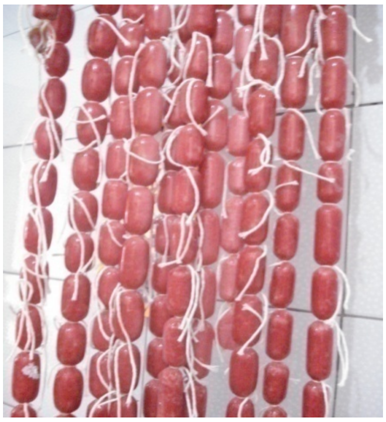


Figura 3.7 Día 4

Figura 3.8 Día 6

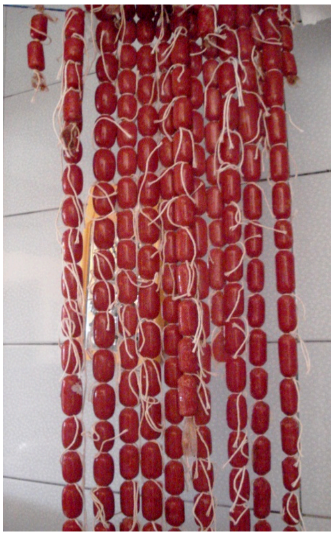


Figura 3.9 Día 7

Figura 3.10 Día 13

Figura 3.11 Día 17

FUENTE: Irina Torres Ruilova, 2008

Las fotografías muestran el cambio de color del producto durante el tiempo de fermentación, secado y maduración.

En el siguiente gráfico se explica como fue la perdida de agua del producto con respecto al tiempo. En la etapa de fermentación hay una significativa pérdida de agua la cual se completa en las etapas de secado y maduración. En total cada muestra pierde el 35 – 40% de agua en total.

Por ejemplo: Peso inicial: 600 gr -----→ 100% de agua

Peso final: 360 gr. ------→ 40% de agua

El snack perdió el 40% de agua durante el proceso de fermentación, secado – maduración.

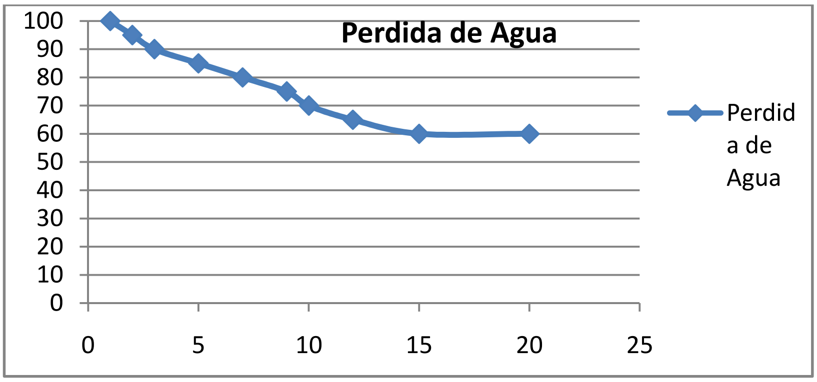


FIGURA: 3.12. Porcentaje de pérdida de agua con respecto al tiempo (días).

FUENTE: Irina Torres, 2008

<u>Extracción de la envoltura:</u>

Una vez terminada la etapa de secado-maduración al snack se le retira la tripa. El producto obtenido se lo empaca sin tripa.

<u>Empacado:</u>

Primero se pesa el snack cárnico en porciones de 75 gramos y se va empacando al vacío en fundas plásticas transparentes.

FIGURA: 3.12 Producto empacado

FUENTE: Irina Torres Ruilova, 2008

DIAGRAMA DE FLUJO

Recepción de materia prima: carne y grasa ← °T: 0 – 1°C. Carnes: 10% grasa pH: 5.8 – 6.0

↓

Clasificación

↓

Preparación de carne y tocino ← Temperatura: -2 a 0°C

↓

Carnes y tocino cortados en trozos

↓ °T: 0 y 1°C

Producción de la mezcla ← Carnes, nitritos, condimento, glucosa, cultivo, probiótico

↓

Mezcla ← Sal y Tocino

↓ 0 – 1°C

Embutido ← Tripas sintéticas

↓

Amarrado

↓

Fermentación ← °T: 28-30°C. pH: 6.0 HR: 90-95%

↓

Secado y Maduración ← °T: 18 – 8°C HR: 88-90%

↓

Producto final ← pH: 4.7 Pérdida de agua: 40%

↓

Extracción de la envoltura

↓

Pesado y Empacado ← °T: 5 - 8°C

3.2 Descripción de Equipos.

Para la elaboración del snack cárnico se usaron los siguientes equipos.

UTESINLIOS PARA CORTAR CARNE CONGELADA

La carne y tocino congelados es cortada en pedazos medianos con la cierra sin fin, la hoja cortadora tiene que estar bien afilada. La persona que realiza esta operación tiene que estar entrenada ya que es una operación peligrosa.

Sierra sin fin: emplea hojas especiales para cortar carne congelada. Esta operación la realiza 1 persona.

FIGURA 3.13: Cierra mecánica

FUENTE: Hanseatica, Importación y ventas de maquinarias, 2002

Una vez cortada la carne y tocino se pesan utilizando una balanza que pese en Kg. Los ingredientes se pesan en balanza gramera o analítica. Todos estos pesos ya están establecidos en la fórmula ya obtenida.

Se busca una mesa limpia de acero inoxidable y se clasifica la materia prima cárnica y demás ingredientes.

Picado en cutter.

Máquinas de sólida construcción en acero inoxidable

Permiten la elaboración de variados tipos de pastas en un corto tiempo de proceso. Distintas velocidades de plato.

Distintas velocidades de eje porta cuchillas.

Sistema opcional de cuchillas y porta cuchillas que permiten el balanceo y calibración de las mismas mediante aparato de reglaje y contrapeso.

Elevador de carros incorporado de accionamiento hidráulico.

Tapa de accionamiento hidráulico o manual

Extractor de pastas de accionamiento hidráulico o manual

Figura 3.14. Cutter

Fuente: Hanseatica, Importación y ventas de maquinarias, 2002

Se debe tener precaución de mantener bien afilados los cuchillos del equipo para evitar un aplastamiento y el posterior calentamiento del material. Primero se incorpora la carne de vacuno congelado la operación debe mantenerse a revoluciones lentas, luego se añade la carne de cerdo. Una vez que se alcance el tamaño del grano deseado se podrá agregar el tocino congelado.

Característica de máquina de picar carne:

En el plato móvil donde se colocan los trozos de carne; estos giran y pasan por un juego de cuchillas; la carne es picada hasta formar el tamaño del grano deseado.

El cutter usado es de acero inoxidable con regulación de velocidad, con capacidad de 20 litros.

EMBUTIDORA:

Relativamente pocos controles deben ser efectuados durante la utilización de una buena embutidora. Las características de una buena embutidora son muy dependientes no sólo de un buen funcionamiento del equipo, sino también de la destreza del operador. Los parámetros que pueden ser regulados y controlados son:

- La masa de producto correspondiente a cada porción individual.
- El vacío a nivel del producto embutido (limitar la cantidad de aire incorporado permite evitar, de forma importante, los riesgos de oxidación).

FIGURA: 3.15 Embutidora

FUENTE: Planta piloto protal,

La masa se retira del cutter y pasa a la máquina embutidora. Esta consiste en una tolva que recibe la pasta, y por medio de un rotor o un tornillo sin fin, empuja la pasta con cierta presión a través de un pico o puntero, hacia el interior de la tripa.

Amarrado:

Una vez embutida la masa se procede a amarrar el embutido. El amarrado se lo realizó manualmente, se usó piolas nuevas. Para realizar esta operación se necesita 2 a 3 personas.

Cámara de maduración y secado.

Pre -reposo y secado**.**

El equipo turbo/AnemostatoEl equipo "Turbo/Anemostato" es apto para el secado de productos en una amplia gama de temperaturas ambiente.

El sistema está constituido por una unidad de tratamiento del agua subdividida en:

- sección frigorífica alimentada por expansión directa de gas o bien por un líquido refrigerante
- sección de calefacción alimentada por agua caliente de caldera, con agua de recuperación de los circuitos frigoríficos, o bien con gas caliente
- sección de ventilación de alta uniformidad.

FIGURA 3.16: Cámara de secado – maduración

FUENTE: Hanseatica, Importación y ventas de maquinarias, 2002

Un cuidado especial se ha prestado a la uniformidad de las condiciones termo-higrométricas del aire a través de la utilización de cones eyectores, difusores y válvula de variación del caudal, todo lo cual permite calibrar de la mejor manera los tiempos de secado. La sección de renovación del aire puede constar de la " renovación entálpica Turbo/Anemostato " que permite reducir notablemente los costos energéticos en presencia de condiciones termo-higrométricas externas favorables.

El controlador del proceso programable con microprocesador controla los distintos aparatos del equipo Turbo/Anemostato de manera que se realicen ciclos ideales de secado, quitando la humedad desde el centro del producto en el menor tiempo posible.

Extracción de la envoltura:

Una vez termina la etapa de secado-maduración el producto sale de la cámara y se le quita la tripa. Este proceso también es manual. Se necesita 2 a 3 personas.

Empaque al vacío

Figura: 3.17 Empacadora al vacío**.**

Fuente: Hanseatica, Importación y ventas de maquinarias, 2002

Para esta operación necesitamos 2 personas. Una para pesar el producto en porciones de 75 gramos usando balanzas grameras y otra para empacar al vacío el snack. Para esta operación se utilizó una maquina que esta conformado por una estructura en acero inoxidable con motobomba para una capacidad de 10 m^3/h., barra de lacre de 315 mm, dimensiones 80x367x322mm. Tapa abovedada en policarbonato de gran resistencia, con espesor de ¾", bisagras en acero inoxidable acopladas a dos cilindros cierra puerta de amortiguación neumática. Switch de seguridad para cierre y apertura de tapa, panel frontal electrónico con display indicador, interruptor On/Off. Pueden utilizarse bolsas con dimensiones máximas de 300 x 350 mm dentro del compartimiento de la máquina.

CAPITULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

El desarrollo del snack cárnico es viable debido a que requiere tecnología básica característica de una microempresa, la materia prima es de fácil adquisición, los insumos utilizados se los encuentra localmente a bajo costo. La tendencia actual del consumidor son las comidas rápidas donde se requiere productos con propiedades funcionales, siendo este portador de las mismas, lo que lo hace muy atractivo para el consumo.

La incorporación de los alimentos funcionales en nuestra alimentación logra estimular el crecimiento de determinados microorganismos beneficiosos para el huésped, mejorando la salud en estados carenciales, intolerancias a determinados alimentos y deficiencias crónicas; de esta manera participan en la prevención de algunas enfermedades y equilibran determinadas déficit. La estabilidad de la flora microbiana intestinal normal es imprescindible para que se lleven a cabo todas las funciones metabólicas del individuo. La demostración de que la microbiota intestinal es un importante componente de barrera en la mucosa ha introducido el concepto de “terapia probiótica” con la administración de *Lactobacillus Acidophilus* bacteria potencialmente beneficiosa. Durante estos últimos años, el interés por los efectos terapéuticos beneficiosos de los probióticos ha crecido enormemente. Se ha descrito que ciertos microorganismos específicos, administrados regularmente, son capaces de mantener el equilibrio de la flora intestinal.

Las materia prima cárnica a utilizar en la elaboración del snack no debe ser PSE (Pálidas, blandas, exudativas) ni DFD (oscuras, firmes y secas) sino del tipo normal con 10% de grasa. Las PSE no permiten una adecuada emulsión y en cambio las carnes tipo DFD por su pH elevado no son microbiológicamente estables.

A partir de las pruebas realizadas se pudo determinar que la mejor opción para el crecimiento de bacterias beneficiosas es la mezcla de 0.13 gramos de *Pediococcus Pentosaceus y Staphylococcus xylosus,* en partes iguales; con 1 gramo de *Lactobacillus Acidophilus y Streptococcus Thermophilus* en partes iguales, obteniendo $2x10^9$ Unidades Formadoras de Colonia por cada gramo de snack.

Para que un probiótico confiera cualquier tipo de efecto tiene que estar presente en un número suficiente, de forma generalizada entre $1x10^9$ y $1x10^{10}$ Unidades Formadoras de Colonias por ración.

La optimización de la fermentación del snack cárnico se la obtiene a temperaturas entre 25 y 30ºC. Temperaturas más bajas no permiten una adecuada fermentación.

El producto empacado al vacío puede permanecer estable más de un mes, ya que por medio de pruebas microbiológicas se determinó la ausencia de bacterias anaerobias como *Clostridium Perfrigens*, además conserva sus características organolépticas como son su textura, color, olor y sabor. Estas pruebas se las realizaron durante un mes por lo que se recomienda se podrían hacer las mismas pruebas durante otro mes o 6 meses.

Se pudo determinar por medio de la prueba sensorial, realizada a un grupo de estudiantes, que no existe una diferencia significativa entre el snack de carne y un salame típico del mercado local.

Se recomienda realizar un estudio de mercado en las principales ciudades del país para determinar la aceptación de un snack cárnico con propiedades funcionales, con la finalidad de reemplazar productos que no poseen estas propiedades, sobre todo en aperitivo o acompañante de comida rápida.

ANEXO A
MiCROORGANISMOS UTLIZADOS COMO PROBIÓTICOS

Lactobacillus spp	***Bifidobacterium spp***	***Lactococcus spp***	***Streptococcus spp***	***Enterococcus spp***	***Bacillus spp***
L. acidophilus	*B. bifidum*	*L. lactis*	*S. thermophilus*	*E. faecium*	*B. subtilis*
L. lactis	*B. longum*	*L.cremoris*	*S. lactis*	*E. faecalis*	*B. coagulans*
L. bulgaricus	*B. infantis*	*L.diacetylactis*			
L. rhamnosus GG	*B.breve*				
L. casei	*B. lactis*				
L. Kefir	*B. adolescentis*				
L.brevis					
L. reuteri					
L.helveticus					
L.plantarum					
L. johnsonii					
L. salivarius					

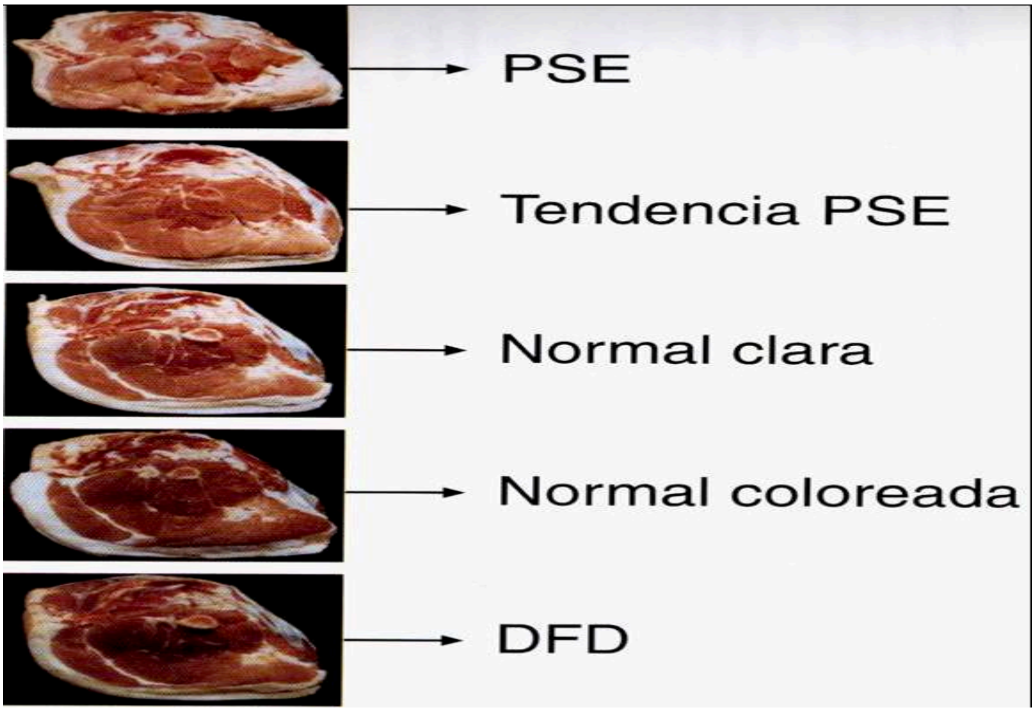
ANEXO B
PRODUCTOS TRADICIONALES Y OTROS MÁS MODERNOS CON CEPAS PROBIÓTICAS

Nombre	**Descripción**	**Cultivio**
Kéfir	Leche fermentada efervescente ácida y ligeramente alcohólica	*L. lactis, L.kefir, L. casei, L. acidophilus, L.bulgaricus, L. brevis, L.cremoris*
Kishk	Mezcla desecada de leche fermentada con cereal, algunas veces sazonadas o condimentada, que se reconstituye con agua en sopa	*S. thermophilus, L. bulgaricus, L. plantarum. L, casei, L. brevis*
M'Bannick	Bebida como el kéfir, con un agradable aroma y refrescante sabor	*L. lactis, L.cremoris, L. plantarum, L. casei*
Actimel	Bebida fermentada condimentada consistencia líquida, agradable sabor.	*S. thermophilus, L. bulgaricus,. L, casei.*
Yacult	Bebida fermentada condimentada consistencia líquida, agradable sabor.	*L. casei*

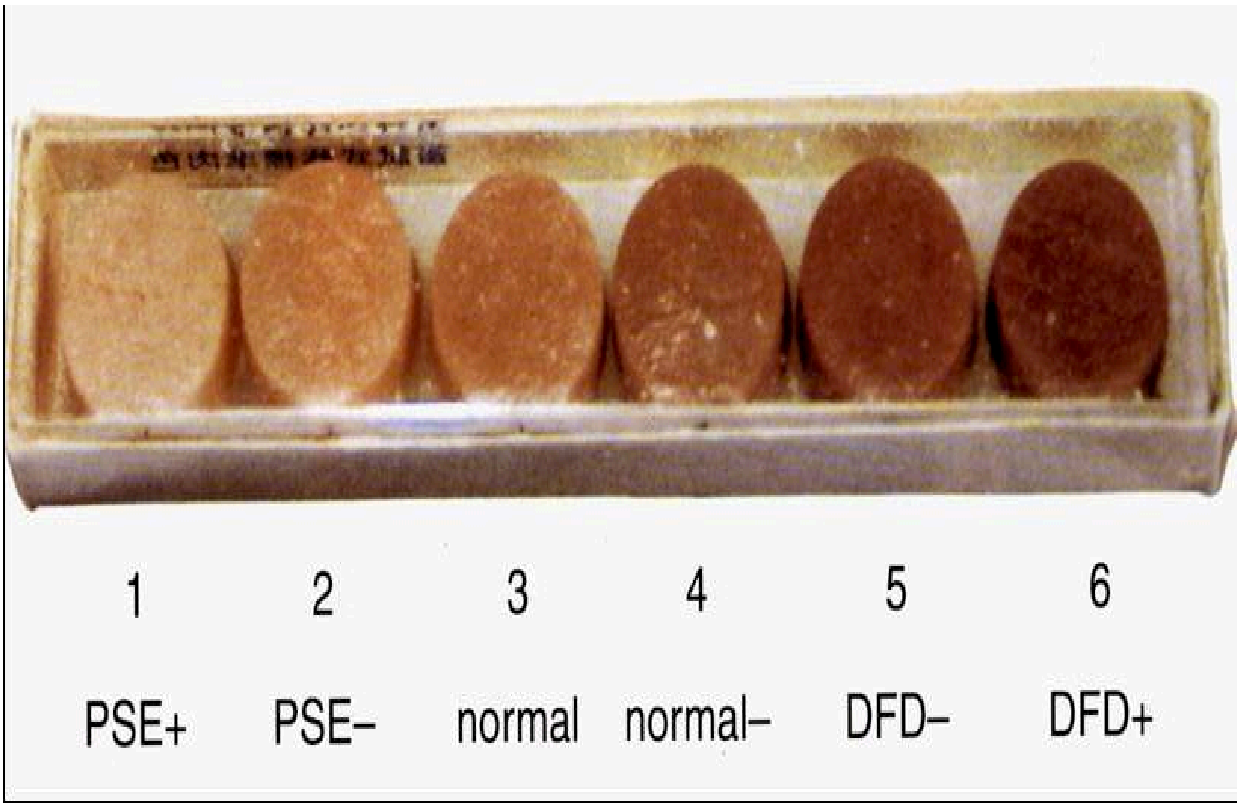
ANEXO C
PRINCIPALES MECANISMOS DE ACCIÓN PROPUESTOS DE LOS PROBIÓTICOS

Acción	**Mecanismo**	**Ejemplo**
Prevención de la colonización por microorganismos patógenos	Bloqueo de receptores específicos (adherencia) y competencia por nutrientes.	*L. plantarum, S. boulardi.*
Actividad antimicrobiana	Producción de sustancias con acción antimicrobiana (H_2O_2, bacteriocinas, ácidos orgánicos...)	*L. rhamnosus GG. S. boulardii.*
Inmunomoduladoras	Regulación de la respuesta inmunitaria humoral y celular	*L. rhamnosus GG. L. acidophilus, Bifodobacterium spp.*
Actividad enzimática	Disminución de la actividad de enzimas asociadas con la síntesis de lactosa, pro carcinógenos, etc	*S. thermophylus, Lactobacillus spp, Bifidobacterium spp.*

ANEXO D



ANEXO E



APENDICE A 1.

TABLA DE SIGNIFICANCIA PARA PRUEBAS DE DOS MUESTRAS

Número de Juicios	PRUEBA DE DOS COLAS		
	Nivel de probabilidad		
	5%	1%	0,10%
5	-----	-----	-----
6	-----	-----	-----
7	7	------	-----
8	8	8	-----
9	8	9	-----
10	9	10	-----
11	10	11	11
12	10	11	12
13	11	12	13
14	12	13	14
15	12	13	14
16	13	14	15
17	13	15	16
18	14	15	17
19	15	16	17
20	15	17	18
21	16	17	19
22	17	18	19
23	17	19	20
24	18	19	21
25	18	20	21
26	19	20	22
27	20	21	23
28	20	22	23
29	21	22	24
30	21	23	25

Número de Juicios	PRUEBA DE DOS COLAS		
	Nivel de probabilidad		
	5%	1%	0,10%
31	22	24	25
32	23	24	26
33	23	25	27
34	24	25	27
35	24	26	28
36	25	27	29
37	25	27	29
38	26	28	30
39	27	28	31
40	27	29	31
41	28	30	32
42	28	30	32
43	29	31	33
44	29	31	34
45	30	32	34
46	31	33	35
47	31	33	36
48	32	34	36
49	32	34	37
50	33	35	37
60	39	41	44
70	44	47	50
80	50	52	56