

## **DEDICATORIAS**

***A DIOS por permitirme llegar al lugar en el que estoy, cumpliendo uno de mis sueños. Por darme los mejores padres y una gran familia.***

***A MI MAMI Eva Suárez por traerme a este mundo con amor, por cuidarme, apoyarme y guiarme en este largo y difícil camino. Eres mi ejemplo a seguir, te quiero mucho.***

***A MI PAPI Alfredo Amézaga por su esfuerzo, paciencia y apoyo incondicional. Con lo cual me respaldo incansablemente para salir adelante en mi formación profesional.***

***A MIS HERMANOS Itzel, Dayani, Alberto, Fernando y Maryel, por cada momento que hemos vivido juntos, los cuales no cambiaría por nada. Por enseñarme a luchar por lo que quiero. Por su alegría y entusiasmo. Los quiero mucho.***

***A EVANGELINA por tu cariño y amistad, por apoyarme y brindarme confianza. Por estar conmigo en los momentos difíciles y ayudarme a seguir a delante. Así como es los más felices y reírte conmigo. Te quiero y respeto mucho.***

***A MIS AHIJADOS Martín, Diana y Deny por la alegría que le dan a mi vida, porque apenas están empezando a brillar, espero que sus sueños se realicen. Luchen por ellos. Los quiero mucho.***

## **AGRADECIMIENTOS**

***A DIOS por bendecirme cada día y por esta gran oportunidad.***

***A ITSON por brindarme esta oportunidad de culminar con mi carrera.***

***A MIS PADRES por su esfuerzo y apoyo para tratar que sea mejor cada día.***

***A MI ASESOR M. C. Olga Nidya Campas Baypoli, por compartir sus conocimientos y amistad.***

***A MIS REVISORES: Ing. Anacleto Félix Fuetes, Q. Jorge Cabrera Pinto, Dra. Ma. Isabel Estrada, por sus comentarios y sugerencias, los cuales fueron de mucha ayuda, para mejorar mi trabajo.***

***A MIS MAESTROS Laura Gassós, Lupita Apodaca, Raúl Olguín, Israel Santos Coy, Diana Patrón. Ampelia Rodríguez, Anacleto Félix, Roberto García, Ernesto García. Ana María Rentaría, por ayudarme en mi formación.***

***A MIS AMIGOS INCONDICIONALES, Lety, Karina, Lizeth, Rosy Violeta, Carmen, Felipe, Wendy, Chary, Beyma, Mayra, Fredy, Bella, Héctor, Marco Antonio, Francisco, por todas las travesuras que hemos hecho juntos y por los momentos que pasamos. Los quiero.***

***A ING. JAVIER DELGADO RODRÍGUEZ, por el apoyo y paciencia. Tqm***

# ÍNDICE

<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	i
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	ii
<b>RESUMEN</b> .....	iii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	v
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	vi
<b>OBJETIVO ESPECÍFICO</b> .....	vii
<b>HIPÓTESIS</b> .....	viii
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	ix
<b>ANTECEDENTES</b> .....	x
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	1
1.1. Generalidades .....	1
1.1.1. Definición .....	2
1.2. Materias Primas .....	3
1.2.1. Harina .....	3
1.2.2. Agua .....	7
1.2.3. Manteca .....	9
1.2.4. Azúcar (SACAROSA, alfa, glucosil-beta-fructosa) .....	9
1.2.5. Sal .....	11
1.2.6. Relleno .....	12
1.2.6.1. Fresa .....	12
1.2.6.2. Piloncillo .....	13
1.2.6.3. Cajeta .....	13
1.2.7. Diagrama de flujo para la elaboración de coyotas .....	14
1.3. Alteraciones microbianas en galletas .....	15
1.3.1. Hongos .....	15
1.3.1.1. <i>Rhizophus stolonifer</i> .....	16
1.3.1.2. <i>Penicillum expansum</i> .....	17

1.3.1.3. <i>Aspergillus niger</i> .....	19
1.3.1.4. <i>Fusarium spp</i> .....	20
1.3.2. Levaduras .....	22
1.3.3. Bacterias .....	22
1.4. Microorganismos indicadores de calidad .....	24
1.4.1. Mesofílicos aerobios .....	25
1.4.2. Hongos y levaduras .....	26
1.4.3. Coliformes totales y fecales .....	27
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	29
2.1. Ubicación del experimento .....	29
2.2. Descripción de la muestra .....	29
2.3. Recolección de la muestra .....	29
2.4. Transporte de la muestra .....	30
2.5. Fechas de muestreo .....	30
2.6. Análisis microbiológicos .....	31
2.6.1. Cuenta total viable de mesofílicos aerobios .....	31
2.6.2. Coliformes totales .....	32
2.6.3. Coliformes fecales por NMP .....	32
2.6.4. Determinación de mohos y levaduras .....	33
<b>III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	34
3.1. Resultados de los análisis microbiológicos .....	34
3.1.1. Cuenta total viable de microorganismos mesofílicos aerobios .....	34
3.1.2. Recuento de mohos y levaduras .....	36
3.1.3. NMP de coliformes totales y fecales .....	38
<b>CONCLUSIONES</b> .....	39
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	40
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	41

**LISTA DE TABLAS**

Tabla	Descripción	Página
1	Especificaciones Sanitarias para galleta con relleno .....	25
2	Fechas de muestreo .....	30
3	Resultados obtenidos de la evaluación en la calidad sanitaria de coyotas para mesofílicos aerobios (UFC/g) .....	35
4	Resultados obtenidos de la evaluación en la calidad sanitaria para hongos y levaduras (UFC/g) .....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Coyota típica .....	2
2	Morfología de la planta de trigo .....	3
3	Molécula del agua .....	7
4	Diagrama de flujo para la elaboración de coyotas .....	14
5	Colonia típica de <i>Rhizopus stolonifer</i> .....	16
6	Vista al microscopio de <i>Rhizopus stolonifer</i> .....	17
7	Colonia típica de <i>Penicillium expansum</i> .....	18
8	Vista al microscopio de <i>Penicillium expansum</i> .....	18
9	Vista al microscopio de <i>Aspergillus niger</i> . ....	19
10	Colonia típica de <i>Aspergillus niger</i> .....	20
11	Colonia típica de <i>Fusarium spp</i> .....	21
12	Vista al microscopio de <i>Fusarium spp</i> .....	21
13	Vista al microscopio de <i>Trichosporon variabile</i> .....	22
14	Colonia típica de <i>Bacillus subtilis</i> .....	23
15	Vista al microscopio de <i>Bacillus subtilis</i> .....	23

## RESUMEN

El presente trabajo se desarrolló en los laboratorios de la Dirección de Recursos Naturales del Instituto Tecnológico de Sonora; Unidad Obregón centro. Cuyo objetivo fue evaluar la calidad sanitaria de coyotas de una microempresa, mediante técnicas microbiológicas, para verificar el cumplimiento de las especificaciones establecidas en la NOM-147-SSA1-1996. El muestreo se realizó en dos etapas; la primera consistió en 5 muestreos, durante los meses de Octubre de 2003 a Febrero de 2004, se hicieron 5 muestreos, en donde la recolección de la muestra fue mensual. La segunda fase del experimento se llevó a cabo en el mes de Noviembre de 2004, realizando 4 muestreos semanales. Los indicadores bacteriológicos que se emplearon fueron: Cuenta total viable de microorganismos mesofílicos (NOM-092-SSA1-1994), mohos y levaduras (NOM-111-SSA1-1994), por el método de vaciado en placa. El número más probable de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos de fermentación múltiple (NOM-112-SSA1-1994). Se analizaron un total de 35 muestras de coyotas, donde el 95% de mesofílicos aerobios durante el primer periodo cumplieron con las especificaciones de <5000 UFC/g, que determina la NOM-147-SSA1-1996, mientras que el 87.5% de cumplimiento para el segundo periodo. Respecto a mohos y levaduras en el primer periodo el 20% de las muestras cumplieron con las especificaciones <50 UFC/g, para el segundo periodo se presentó un incremento del 87.5%. Lo que determina que es la segunda etapa mejoró el proceso de producción ya que se utilizaron buenas prácticas de manufactura.

Para coliformes totales y fecales el 100% de las muestras en ambos periodos estuvieron dentro de la NOM-147-SSA1-1996, ya que no se detectó la presencia de estos microorganismos. El 8.57% de las muestras no cumplieron con los tres indicadores de calidad que indica la norma. Estos indicadores nos permiten concluir que las condiciones higiénicas con las que se procesa este producto son adecuadas, debido a la carga microbiana baja que presentan. Por lo que este alimento es apto para el consumo humano desde el punto de vista microbiológico, siempre y cuando se sigan observando estrictos controles sanitarios en el proceso de fabricación del producto.



## INTRODUCCIÓN

La seguridad alimentaría es un concepto muy amplio y de suma importancia en el control de calidad de las empresas. La responsabilidad de la industria de procesamiento de alimentos es garantizar a los consumidores que sus productos son saludables y que cumplen los requisitos legales. Las industrias alimenticias utilizan diferentes herramientas para asegurar la calidad y la seguridad de los alimentos que producen, entre los cuales están las buenas prácticas de manufactura, análisis de riesgo y puntos críticos de control y seguimiento de normas y procedimientos de aseguramiento de calidad. Debido al desarrollo de la producción de alimentos donde las empresas han experimentado un gran crecimiento, se puede decir que la mayor parte de las mismas prestan especial atención al control de calidad tratando de mantener niveles de seguridad óptimos para el consumidor a la hora de elegir su producto. Sin embargo, todavía existen algunos casos en donde ya sea debido a que se trata de empresas muy pequeñas (microempresas) o a que las políticas seguidas por los organismos legales de la región no son demasiado estrictas, todavía se encuentran cierto tipo de alimentos que no son adecuadamente monitoreados o cuya calidad sanitaria no es estrictamente controlada. El presente trabajo se centra en el mercado específico regional de Ciudad Obregón, Sonora, estudiando un alimento típico regional, una especie de galleta cuyo nombre "Coyota" es popular y tiene presencia marcada entre la población, pretendiendo hacer una evaluación microbiológica y sanitaria de los productos de una microempresa de este ramo, para posteriormente proporcionar alternativas y opciones para mejorar el nivel sanitario de los mismos, y así contribuir al desarrollo de la empresa y al bienestar del consumidor final.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la calidad sanitaria de coyotas de una microempresa, mediante técnicas microbiológicas, para verificar el cumplimiento de las especificaciones establecidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-147-SSA1-1996.

## OBJETIVO ESPECÍFICO

- ✓ Determinar la carga microbiana de las coyotas mediante la cuantificación de mesofílicos aerobios por la técnica vaciado en placa basándose en los procedimientos indicados en la Norma Oficial Mexicana 092-SSA1-1994.
- ✓ Realizar la cuenta total viable para la cuantificación de hongos y levaduras por la técnica vaciado en placa basándose en los procedimientos indicados en la Norma Oficial Mexicana 111-SSA1-1994.
- ✓ Determinar el número más probable de coliformes totales y fecales con la técnica número más probable basándose en los procedimientos indicados en la Norma Oficial Mexicana 112-SSA1-1994.
- ✓ Comparar los resultados obtenidos contra la Norma Oficial Mexicana 147-SSA1-1996, aplicable a las especificaciones sanitarias correspondientes a cereales y sus productos, para determinar la calidad sanitaria del producto.

## **HIPÓTESIS**

Las coyotas fabricadas en este establecimiento tienen una baja carga microbiana, debido a las buenas prácticas de manufactura, por lo cual deberían cumplir con los requisitos de la NOM-147-SSA1-1996.

## JUSTIFICACIÓN

Las coyotas son un producto de la región, consta de galleta crujiente, que en su interior tiene relleno el cual puede ser de piloncillo, cajeta o fresa. Su sabor es característico y diferente a otros tipos de galleta con relleno, por tal motivo es muy consumido y preferido, tanto por las personas que aquí viven, como aquellas que vienen de fuera.

Debido a las características nutricionales de este alimento es posible que se desarrollen microorganismos, los cuales no son deseados. Por lo que es de suma importancia que este producto se elabore aplicando las buenas prácticas de manufactura, ya que se trata de un alimento de consumo inmediato. A su vez que no represente ningún riesgo a la salud del consumidor.

Por lo tanto es importante que cumpla con los criterios microbiológicos de la NOM-147-SSA1-1994, en donde indica límites máximos de microorganismos como mesofílicos aerobios, coliformes totales y fecales, hongos y levaduras, presentes en la galleta con relleno.

## **ANTECEDENTES**

El presente estudio formó parte del “Proyecto de Evaluación de Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de una microempresa productora de coyotas”, en donde la primera etapa correspondió a un diagnóstico sanitario de superficies vivas e inertes del proceso de producción de coyotas. Los indicadores utilizados fueron determinación de mesofílicos aerobio y coliformes totales, en superficies vivas e inertes. Los resultados mostraron que el 100% de las muestras cumplieron con la NOM-093-SSA1-1994. Sólo se presentó mayor número de crecimiento de hongos, después de que se presentaron fenómenos naturales como lluvia o vientos fuertes. Terminada esta etapa de investigación se dió una inducción al personal para mejorar el proceso, se les indicó como deben presentarse a trabajar, así como la higiene que deben tener al estar en contacto con el producto, como desinfectar el equipo antes y después de utilizarlo. Además cuidar las instalaciones, eliminar corrientes de aire principalmente (Mungia, 2003).

La segunda etapa consistió en evaluar la calidad sanitaria de coyotas como producto terminado, este se dividió en dos fases con la finalidad de encontrar diferencias en la carga microbiana del producto, antes y después de las mejoras realizadas al proceso de producción.

## I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. Generalidades

La Historia de las Galletas se remonta unos 10,000 años atrás cuando se descubre que al someter al calor excesivo sopas de cereal, se obtenía un alimento con bajo contenido de agua excelente para el almacenaje y su conservación.

- 200 A.C se firma realmente el nacimiento de la galleta con los "dipyress" Griegos o los "Bis Coctum" romanos, que significa panes cocidos dos veces y de donde nace la palabra galleta en inglés y francés biscuit.
- En América las galletas surgen de manera accidental cuando pequeñas cantidades de masa de pastel, se metían al horno para probar su temperatura. Estas pequeñas pruebas para pastel se llamaban "koekje", que en holandés significa pequeño pastel y de donde viene la palabra cookie.
- Durante la edad media, evolucionaron y florecieron varios tipos de galletas, desde entonces las galletas dulces o saladas son cada vez más variadas.
- A finales del siglo XVIII y comienzos del XIX, comienza en Europa la producción masiva de galletas y su comercialización (<http://www.amexigapa.com.mx/2NIV/Galletas/2n5.htm>).

### 1.1.1. Definición

La NOM-147-SSA1-1996, define a las galletas como un producto elaborado fundamentalmente, por una mezcla de harina, grasas y aceites comestibles o sus mezclas y agua, adicionada o no de azúcares, de otros ingredientes opcionales y aditivos para alimentos, sometida a proceso de amasado y posterior tratamiento térmico, dando lugar a un producto de presentación muy variada caracterizado por su bajo contenido en agua.

Esta definición puede ser aplicada a la coyota Figura 1, debido a que es un producto cuyas características son muy similares a las descritas por esta norma.



Figura 1. Coyota típica. Fuente: <http://www.coyotaslulu.com/>



## 1.2. Materias primas.

### 1.2.1 Harina.

El trigo constituye un componente esencial del régimen alimenticio de numerosos países, como fuente fundamental de glúcidos y calorías, pero las proteínas del trigo también constituyen la mayor parte de las proteínas consumidas por numerosas regiones (Cheftel, 1989).

Las principales características de la planta del trigo se muestran en la Figura 2.

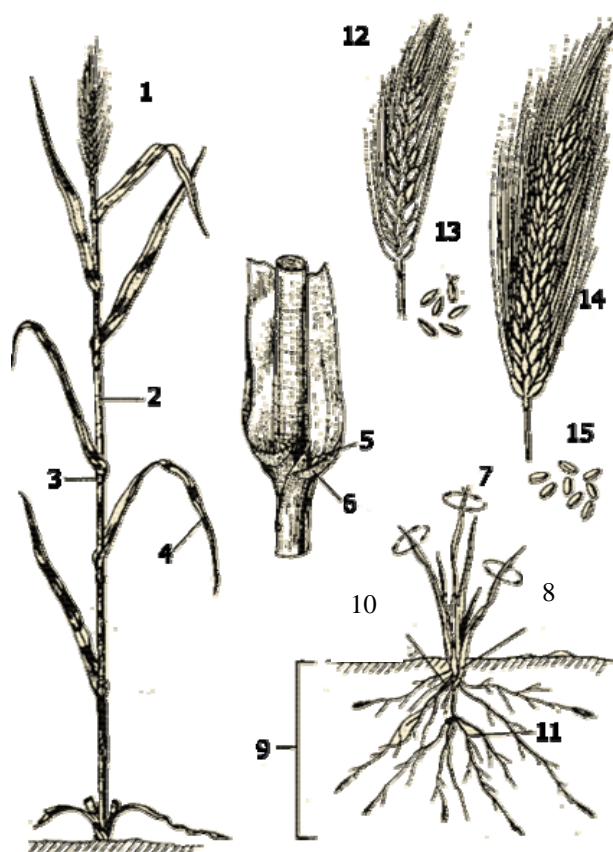


Figura 2. Morfología de la planta de trigo. Fuente: Contreras, 2004.

1. La altura que varía entre los 30 y 180 cm.
2. El Tallo es recto y cilíndrico. Tiene nudos
3. El nudo es sólido. La mayoría de los trigos tienen seis nudos.
4. La hoja es lanceolada, con un ancho de 0,5 a 1 cm y una longitud de 15 a 25 cm. Cada planta tiene de cuatro a seis hojas.
5. La lígula es de longitud media.
6. La aurícula es despuntada y tiene pelos.
7. En la plántula las hojas se despliegan al nacer, girando en el sentido de las manecillas del reloj.
8. Amacollamiento. Esta es otra característica en los cereales. Las plántulas producen macollos de número variable, generalmente de dos a siete.
9. Las raíces del trigo.
10. Las raíces permanentes o secundarias nacen en el primer nudo.
11. Raíces que nacen a partir de la semilla. Normalmente existen cinco raíces seminales, una radical o primaria y cuatro laterales, que funcionan durante toda la vida de la planta.
12. La espiga del trigo macarrón es densa y corta. Consiste en una infinidad de espiquillas que terminan en una arista o barba.
13. Los granos del trigo macarrón son generalmente alargados, puntiagudos, durísimos y de color ámbar rojizo.
14. Espiga del trigo común.
15. Los granos del trigo común pueden ser blandos o duros (Contreras, 2004).

El trigo es el principal ingrediente en la fabricación del pan. Una parte de la proteína del trigo se llama gluten. El gluten facilita la elaboración de levaduras de alta calidad, que son necesarias en la panificación (Manuales para la educación agropecuaria, 1999).

Las proteínas del grano del trigo, gladias y gluteninas, constituyen la parte del gluten materia lipoproteica cohesiva, viscoelástica, que se puede obtener libre de almidón amasando la harina de trigo bajo una corriente de agua. Estas proteínas son las responsables de la extensibilidad (gladias) y de la elasticidad (gluteninas) de la masa de panadería, durante el proceso de panificación (Cheftel, 1989).

Existen dos variedades de trigo que se utilizan en la elaboración de galletas y pan:

*Triticum vulgare*.- Se muele con el fin de producir una harina que se emplea para la confección de pan, tortas, galletas o productos similares.

*Triticum durum*.- Se emplea principalmente como sémola para la fabricación de pastas alimenticias. Pero si se puede utiliza en la producción de pan y galleta (Quaglia, 1991).

Obtención de harina.- El hombre tiende a eliminar las capas exteriores a la almendra durante el tratamiento de los cereales, con el fin de obtener una harina más agradable de consumir. El interés de esta operación tecnológica es difícil de establecer, ya que por un lado, la harina blanca, esta muy empobrecida en nutrientes, mientras que por otro, se eliminan a los elementos indigeribles. La harina aporta menos nutrientes aunque no tiene efecto de desasimilación sobre el bolo alimenticio. Lo cereales son alimentos energéticos (Frangne, 1990).

Se distinguen generalmente dos tipos de molienda de cereales: la molienda en húmedo y la molienda en seco. Se han desarrollado recientemente técnicas especiales de molienda que permiten el fraccionamiento de los granos para responder a necesidades muy específicas (Mazza, 2000).

En primer lugar se acondiciona el grano de forma que el contenido de humedad sea optimo, un 15%. Luego se tritura el grano con rodillos estriados que giran con velocidades diferentes. Se trata de conservar el salvado en trozos de mayor tamaño

posible y hacer salir el endospermo, que es separado en forma de partículas gruesas. Con una combinación de cribado y aspiración. Se separan en trozos mayores y más ligeros de salvado, y después se reducen de tamaño progresivamente los trozos de endospermo hasta el polvo que llamamos harina (Manley, 1989).

El germen es blando y más rico en lípidos que el resto que las otras dos partes y durante la reducción del endospermo a harina se transforma en escamas planas más grandes, facilitándose su eliminación por tamizado (Manley, 1989).

A través de las fases de molienda del trigo se obtienen una serie de productos características químicas diversas: harina, harinilla, residuos de harina, salvado, salvado fino y desechos de molienda. Considerando que la carióspside esta formada de las siguientes partes: 12.5% salvado, 85% albúmen y 2.5 de germen, la molienda consiste en separar el 85% de albúmen de la otra parte y transformándolo, por consiguiente en harina (Quaglia, 1991).

Después de la elaboración, la harina debe dejarse madurar por un cierto periodo de tiempo con el fin de alcanzar el punto óptimo de sus características y tecnológicas; el tiempo requerido depende de varios factores tales como la variedad de trigo, el tipo de elaboración, la conservación del trigo y de la harina (Quaglia, 1991).

Si la harina se conserva en un ambiente inadecuado, las enzimas comienzan a atacar lo componentes del trigo; alfa, beta amilasa, que en el trigo no están en condiciones de atacar al almidón, después de la molturación inician las transformaciones de los gránulos de almidón degradándolos, produciendo maltosa y dextrina, las proteasas actúan sobre las proteínas simplificando esta molécula a péptidos y algo en aminoácidos. En este proceso se forman sustancias aptas como nutrientes de utilización inmediata para las levaduras que se añaden a la masa del pan (Quaglia, 1991).

Materias extrañas en la harina.- Por desgracia, la harina dista mucho de ser un producto estéril y libre de materias extrañas. La naturaleza del trigo, las condiciones de recolección, el almacenamiento y la limpieza anteriores a la fabricación, todo ello tiene una relación con los extras que se pueden encontrar en ellas. Es conveniente tener noticia de lo que puede o tiene siempre que estar presente. Las bacterias y los hongos abundan en el suelo en cifras astronómicas y como el polvo del campo esta presente en el trigo, no es sorprendente que el trigo sea también rico en microflora (Manley, 1989).

### 1.2.2. Agua.

La molécula del agua esta constituida por dos átomos de hidrógenos unidos en forma covalente a uno de oxígeno, es altamente polar, no es lineal y crea estructuras tridimensionales debido a las orbitales s y p del oxígeno; las 1s del hidrógeno comparten 2 electrones con las híbridas  $sp^3$  del oxígeno. A su vez, este elemento tiene un par de electrones libres consideradas como dos fuerzas separadas, que junto con los dos enlaces covalentes, establece una molécula con forma de tetraedro, como lo muestra la Figura 3 (Badui, 1993).

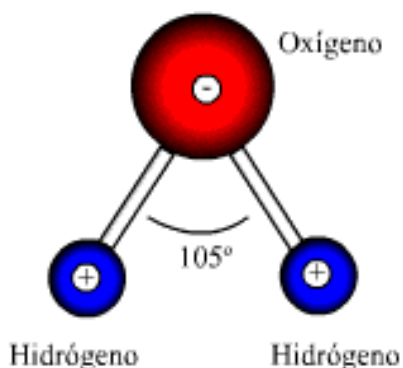


Figura 3. Molécula del agua. Fuente: Raisman, 2003.

El agua debido a que no tiene un valor energético, ya que no sufre cambios químicos durante su utilización biológica, en muchas ocasiones no se considera como nutrimento; sin embargo, sin ella no podrían llevarse a cabo las reacciones bioquímicas. El agua es un factor determinante en la inhibición o propagación de las diferentes reacciones que puedan aumentar o disminuir la cantidad nutritiva y sensorial de los alimentos (Badui, 1993).

El agua es un ingrediente particular en las masas de galletería. Es una sustancia no nutritiva ya que permite que se produzcan cambios en otros ingredientes, tanto para formar una masa como luego para producir una textura rígida después de cocer. La mayor parte del agua añadida a la masa es eliminada en el horno, pero la calidad del agua utilizada puede tener su comportamiento en la masa. En la mayoría de las factorías galleteras el agua proviene de la traída municipal de agua potable, y la responsabilidad de su pureza queda a cargo de la autoridad correspondiente. Deben considerarse tres exigencias en la calidad de agua: pureza microbiológica, concentración y naturaleza de sustancias disueltas, color y turbidez (Manley, 1989).

Es esencial que el agua utilizada para amasar este libre de microorganismos, ya que muchos de los demás ingredientes de la masa serán ricos en bacterias y esporas de hongos, y todos ellos se destruirán en la cocción. El agua infectada estará probablemente contaminada de otra forma que puede tener efectos perjudiciales para la salud, incluso cuando los microorganismos sean destruidos. Las sustancias disueltas en agua están recibiendo más atención, los pueden afectar significativamente a algunos procesos de la cocción y hay preocupación creciente sobre trazas de metales pesados como el As, Pb y Mg en los alimentos, que son perjudiciales para la salud, particularmente porque se acumulan en el cuerpo (Manley, 1989).

En cuanto al color y turbidez del agua, esta debe de ser incolora y cristalina , si se presentan problemas en la coloración se puede deber a la contaminación bacteriológica u otras materias (Manley, 1989).

El agua hidrata la harina facilitando la formación del gluten, con ello y con el trabajo mecánico del amasado se le confieren a la masa sus características plásticas: la cohesión, la elasticidad, la plasticidad y la tenacidad o nervio. La presencia de agua en la masa también es necesaria para el desarrollo de las levaduras que han de llevar a cabo la fermentación del pan (Calvel, 1994).

### 1.2.3. Manteca.

Es la grasa mas comúnmente utilizada porque confiere al pan una particular textura que le hace aceptable por el consumidor. Desde el punto de vista tecnológico, es el vehículo adecuado para distribuir más uniformemente la masa (Giovanni, 1991).

### 1.2.4. Azúcar (SACAROSA, alfa,glucosil-beta-fructosa).

Disacárido no reductor, extraído de la caña de azúcar y la remolacha, formado por una molécula de glucosa y otra fructosa unidas mediante un enlace tipo 1  $\Rightarrow$  2. soluble en agua, e hidrolizada por la sacarosa o invertasa y da lugar al azúcar (Frangne, 1990).

La sacarosa reduce la actividad de agua (valor aw) de un sistema y por lo tanto reduce las oportunidades de vida microbiana de forma selectiva. Puesto que el valor aw de las soluciones saturadas de azúcar es aproximadamente de 0.85 y algunos microorganismos, aún pueden crecer por debajo de este límite hasta 0.60, los

alimentos no pueden protegerse de la contaminación microbiana únicamente con este azúcar disacárido (Jarger, 2000).

Aunque la sacarosa se añade a muchos productos horneados, principalmente para impartir sabor dulce, frecuentemente es también un factor crucial para su conservación. Ejemplos típicos del uso de azúcar como conservante son las galletas y los dulces. Dependiendo del tipo de producto, si su contenido de azúcar se encuentra del 20 al 50%, estas cantidades de azúcar producen actividades de agua del 0.90 al 0.83, que frecuentemente son adecuadas para la eficaz conservación duradera (Jarger, 2000).

Además de su acción conservante, la sacarosa imparte sabor sumamente dulce, lo que realmente constituye la principal razón, en muchos casos, para usar el azúcar como ingrediente alimenticio. En el margen de baja concentración, principalmente inferior al 10%, la sacarosa carece de propiedades conservantes y de hecho sirve como nutriente, que aporta energía fácilmente a muchos microorganismos bien directamente, o después de la conversión del disacárido por hidrólisis en los monosacáridos componentes glucosa y fructosa (Jarger, 2000).

Los azúcares que se añaden a la masa para elaborar algunos productos horneados, además de la función de conferir un sabor dulce y ser alimento para las levaduras, tiene efecto sobre la propiedad de absorción, sobre el tiempo de desarrollo de la masa y sobre las características organolépticas del producto (Quaglia, 1991).

Además el azúcar tiene efectos sobre las características organolépticas del producto final, esto es sobre el color de la superficie y su aroma. El color de la superficie del pan se debe a la reacción entre los azúcares y los aminoácidos (reacción de Maillard) y a la caramelización de los azúcares por el calor: según el tipo y la cantidad de los azúcares utilizados se obtiene un color moreno más o menos intenso (Quaglia, 1991).



El azúcar actúa también en la formación del aroma, por este motivo los panes especiales donde se permite el empleo del azúcar se añade en cantidad mayor (2-7%) de la necesaria para producir anhídrido carbónico, en fin, asegura también una mejor conservación del producto ya que permite una mejor retención de la humedad manteniendo más tiempo su blandura inicial y retrasando el proceso de endurecimiento (Quaglia, 1991).

#### 1.2.5. Sal.

La sal común reduce la actividad de agua (valor aw) de un sistema y por tanto disminuye además inespecíficamente las condiciones favorables para la vida microbiana (Jarger, 2000).

Retrasa la velocidad de fermentación y también inhibe la acción de las enzimas proteolíticas sobre el gluten (Manley, 1989).

Cuando se adiciona sal, dosificada según el tipo de harina, aumenta la compactidad de las masas haciéndoles más fácil de trabajar. También es posible una mejor hidratación de las masas, sin que se vuelvan pegajosas. La sal por su propiedad antiséptica actúa también durante la fermentación, retardando especialmente las fermentaciones secundarias de los microorganismos productores de ácidos tales como el ácido acético, el butírico y el láctico y disminuye el desarrollo del anhídrido carbónico, con una relativa disminución de la porosidad del producto (Quaglia, 1991).

La sal favorece además la coloración de la superficie del pan, dando a la corteza una coloración más viva, haciéndola más crujiente y confiriéndole un aroma más intenso. La sal influye también en la duración y estado de conservación del producto, debido a su capacidad de absorber agua (Quaglia, 1991).

### 1.2.6. Relleno.

Ingrediente agregado antes o después del horneado y que se encuentra en la parte interna o entre dos o más unidades de los productos de panificación ( NOM-147-SSA1-1996).

#### 1.2.6.1. Fresa.

La elaboración de mermeladas sigue siendo uno de los métodos más populares para la conservación de fruta. Una mermelada verdaderamente buena presentara un color brillante atractivo, reflejando el color propio de la fruta. Aparecerá bien gelificada sin demasiada rigidez, de forma que pueda extenderse bien y debe tener un buen sabor afrutado. También debe conservarse bien cuando se almacena en un lugar fresco y preferentemente oscuro y seco (Shouthgate, 1992).

Todos los que tienen experiencias en la elaboración de mermeladas saben que resulta difícil tener éxito en todos estos puntos, incluso cuando emplean una receta bien comprobada, porque varían las materias primas. Las frutas difieren según sea su variedad, la estación de año o su grado de maduración. Incluso el tamaño y la forma de las cacerolas empleadas para la cocción influyen sobre el resultado final al variar la rapidez que se evapora el agua durante la cocción (Shouthgate, 1992).

Lo primero a considerar es la fruta, que será tan fresca como sea posible e iniciando su maduración. Con frecuencia se utiliza una mezcla de fruta madura y algo verde y los resultados son bastantes satisfactorios. La fruta demasiado madura no resulta apropiada ya que la conserva no gelifica bien. La fruta se recolectará cuando está seca y si ha sido lavada se encontrará tan seca como sea posible al secarla. Las fresas tienen una escasa capacidad de gelificación (Shouthgate, 1992).

Algunos defectos comunes y causas probables de mohos en la mermelada son:

- ☞ Fruta húmeda o de mala calidad
- ☞ Limpieza defectuosa de tarros o cierres antes usados
- ☞ Cierres colocados incorrectamente
- ☞ Tratamiento térmico insuficiente
- ☞ Tarros no cubiertos por el agua en el baño maría (Shouthgate, 1992).

#### 1.2.6.2. Piloncillo.

Desde tiempos remotos el piloncillo ha sido utilizado para preparar y endulzar postres y atoles. El piloncillo no es otra cosa que azúcar de caña no refinada, con forma de pilón o cono. Cuenta la historia que los pueblos mesoamericanos, que no conocían el azúcar, no tenían necesidad de los endulzantes debido a que estaban acostumbrados a los fuertes sabores de sus productos naturales. Y cuando requerían endulzar un platillo, utilizaban el jugo de algunas plantas, como por ejemplo el aguamiel que sacaban del maguey. Hernán Cortés fue el iniciador del cultivo de caña, la cual fue introducida en México en el siglo XVI, desde la isla de Cuba. Al hervir el jugo de la caña directamente al fuego en grandes pailas (ollas gigantes), se obtiene una miel espesa, que luego se puede convertir en piloncillo. Posteriormente se convirtió en un ingrediente indispensable para la elaboración de un sin número de postres y panes muy tradicionales de la cocina mexicana. El piloncillo fue y sigue siendo un rico ingrediente azucarado (<http://www.vanguardia.com.mx/circulo/archsociales/febrero/28/d5.html>).

#### 1.2.6.3. Cajeta.

La Norma Oficial Mexicana NMX-F-480-1985, define a la cajeta como el producto elaborado con leche de cabra o de vaca, o la mezcla de éstas, adicionada de

azúcares, aditivos e ingredientes permitidos por la Secretaría de Salud, procesados en caliente hasta obtener la viscosidad y color necesario que caracteriza al producto ([www.salud.gob.mx](http://www.salud.gob.mx)).

Se denomina como cajeta al producto que contenga 28% de agua, 7.5% de materia grasa de la leche, 2% de cenizas y 63% de azúcar. La tecnología para la elaboración de cajeta se basa esencialmente en el manejo del azúcar, su principal ingrediente, con vistas a la obtención de diversas texturas, las cuales se logran mediante la regulación del estado de cristalización del azúcar y de la humedad (<http://www.contactopyme.gob.mx/guiasempresariales/guias.asp?ins=74&s=14>).

#### 1.2.7. Diagrama de flujo para la elaboración de coyotas.

En la Figura 4 se puede observar los principales pasos en la elaboración de las coyotas.

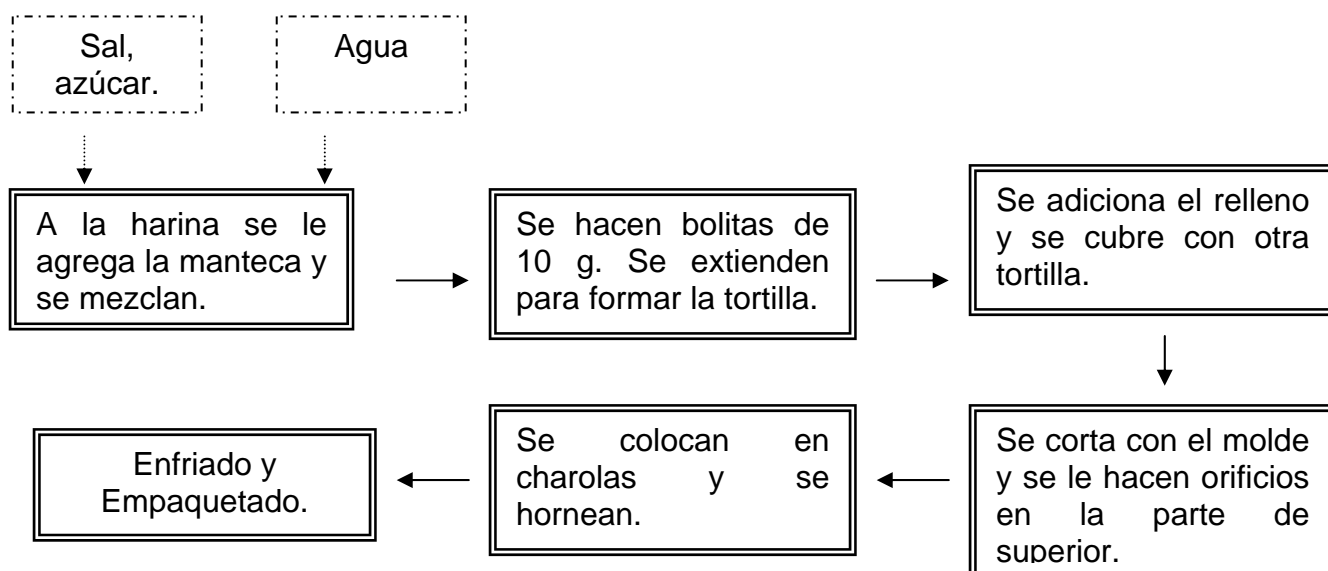


Figura 4. Diagrama de flujo para la elaboración de coyotas.

Fuente: [www.gob.mx/portal/runscript.asp](http://www.gob.mx/portal/runscript.asp).

### 1.3 Alteraciones microbianas en galletas.

Los mohos son los responsables de la mayoría de los problemas alterativos. La baja actividad de agua inhibe eficazmente el crecimiento de bacterias siempre que las condiciones de almacenamiento sean satisfactorias (Diane, 2000).

Después del horneado el producto está prácticamente exento de microorganismos vivos, pero, durante el tiempo que permanece enfriándose y antes de ser envuelto, está expuesto a la contaminación por las esporas de mohos existentes en el aire (Adams y Moss, 1997).

Si la atmósfera es húmeda, las esporas fúngicas en la galleta, forman un micelio blanco-grisáceo o de otros colores y más adelante una masa de esporas amarilla, roja, verde o negra (Muller, 1981).

Sin embargo, las condiciones indican que si hay baja humedad se retarda el crecimiento de los mohos y de aquí que este tipo de alteraciones generalmente solo se pueda observar cuando el pan se guarda en un ambiente de elevada humedad o cuando se envuelve estando todavía caliente (Jay, 2002).

#### 1.3.1 Hongos.

Los mohos pueden proceder del aire durante la fase de enfriado y, posteriormente, de la manipulación o de las envolturas. Los principales mohos que intervienen en esta alteración son: *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger*, (Frazier y Westoff, 2000).

### 1.3.1.1 *Rhizopus stolonifer*.

Suele conocerse como el moho del pan ya que se encuentra con frecuencia en este alimento. Desde el punto de vista morfológico no son tabicados, produce un micelio de color blanco y de aspecto algodonoso con esporangiosporas que emergen en los nódulos donde se forman los rizoides y posee un moteado negro correspondiente a los esporangios y crece rápidamente, Figura 5 (Pelczar, 1993).



Figura 5. Colonia típica de *Rhizopus stolonifer*.

Fuente: [www.kabi.jp/html/jp/osennrei2](http://www.kabi.jp/html/jp/osennrei2)

Estos mohos producen racimos de hifas parecidas a raíces de sostén “llamadas rizoides”, así como estolones o tallas rastrero, capaces de desarrollar raíces que originaran nuevos organismos, ver Figura 6 (Pelczar, 1993).

El ciclo sexual empieza con fusión de ramas de hifas llamadas progametangios de dos micelios fisiológicamente diferentes, pero compatibles. Estas establecen contacto una con otra y sus extremos se separan de las células suspensoras vecinas. Los gametangios se fusionan y forman una cigospora, que madura produciendo una pared gruesa, negra y verdosa (Carpenter, 1984).

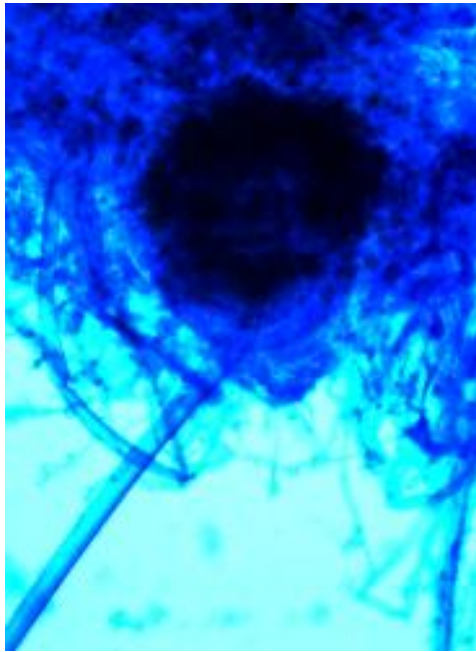


Figura 6. Vista al microscopio de *Rhizopus stolonifer*.

Fuente: Oppermann, 2003.

#### 1.3.1.2 *Penicillium expansum*.

Las colonias tienen consistencia aterciopelada y color verdoso o azul verdoso y pueden tener de 30 a 40 mm de diámetro. Las hifas tabicadas penetran en el sustrato o crecen por enzima del mismo y nacen a intervalos hifas aéreas

fecundas tabicadas, que a veces se ramifican y sirven de apoyo a los conidios, que crecen o se expanden a partir de los esterigmas ver Figura 7 (Carpenter, 1984).



Figura 7. Colonia típica de *Penicillium expansum*.

Fuente: Pitt, 2000.

Los conidióforos pueden ser ramificados y tener cabezas con aspecto de cepillo que contienen esporas ver Figura 8. Conglomerados de esterigmas se encuentran por lo general en un sólo lugar y de cada una se forman cadenas de conidias. El color del organismo maduro sirve de ayuda para identificar la especie. Crecen mejor a temperaturas de 15 a 30 °C (Pelczar, 1993).



Figura 8. Vista al microscopio de *Penicillium expansum*.

Fuente: Pitocchelli, 2004.



### 1.3.1.3 *Aspergillus Níger*.

Están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Algunas especies se hallan involucradas en el deterioro de los alimentos. Los aspergilos producen un micelio tabicado, ramificado, con la parte vegetativa introducida en el nutriente ver Figura 9. Los conidióforos o hijas fértiles, emergen de las células del pie que también están en el sustrato. Los conidióforos son tabicados o no tabicados. Las conidias tienen un color desde pardo-verdoso, o pardo con un tinte morado, a negro y que produce un pigmento amarillo, ver Figura 10. Se desarrollan en concentraciones altas de azúcar y sales, esto indica que pueden tomar el agua que necesitan de sustancias relativamente secas (Pelczar, 1993).

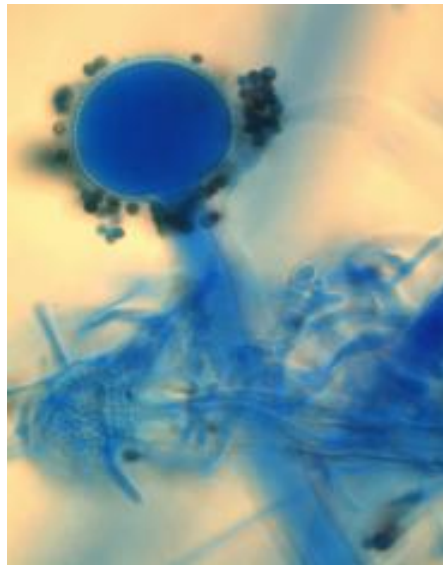


Figura 9. Vista al microscopio de *Aspergillus niger*.

Fuente: Oppermann, 2003.

En el sustrato o por encima de él crecen las hifas vegetativas tabicadas. Se ramifican y se extienden al aire los conidióforos fecundados: el extremo del conidióforo aumenta el tamaño para que las vesícula, aumenten sus esterigmas (Carpenter, 1984).



Figura 10. Colonia típica de *Aspergillus niger*.

Fuente: Johnson, 1996.

#### 1.3.1.4. *Fusarium* spp.

Se hallan muy difundidos en la naturaleza y frecuentemente contaminan los medios de cultivo principalmente el trigo, ya que sus esporas se diseminan con las corrientes aéreas. También abundan en el suelo, la materia vegetal y alimento en descomposición. Muchas de estas especies se han relacionado con las enfermedades de las plantas, *Fusarium moniliforme*, produce giberelina, compuesto del ácido giberélico, un estimulante de crecimiento de la planta (Pelczar, 1993).

La fusaria se caracteriza por sus conidias multicelulares, sufusiformes y falciformes que nacen en conidióforos que se agrupan con los rayos de una rueda, en hifas cortas ramificadas ver Figura 11 y 12 (Pelczar, 1993).

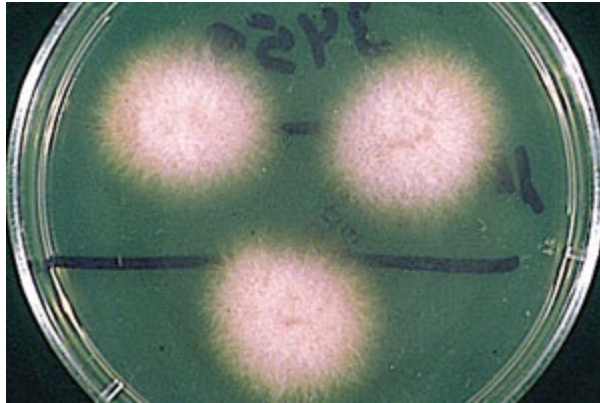


Figura 11. Colonia típica de *Fusarium* spp.

Fuente: Tapia, 1996

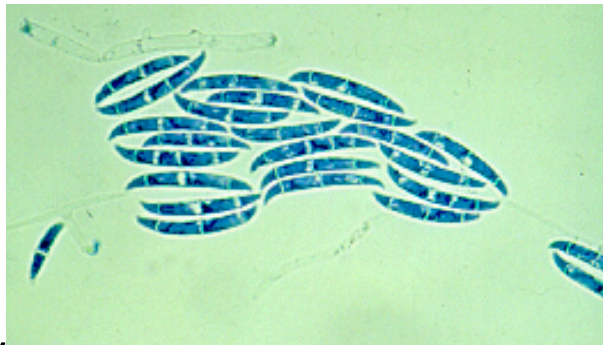


Figura 12. Vista al microscopio de *Fusarium* spp.

Fuente: Ellis, 2005.

### 1.3.2 Levaduras.

La alteración yesosa se debe a *Trichosporon variabile* y *Endomycoopsis fibulifera* ver Figura 13. Presenta manchas blancas apareciendo como espolvoreado con yeso, especialmente en la superficie y en las zonas de corte (Muller, 1981).

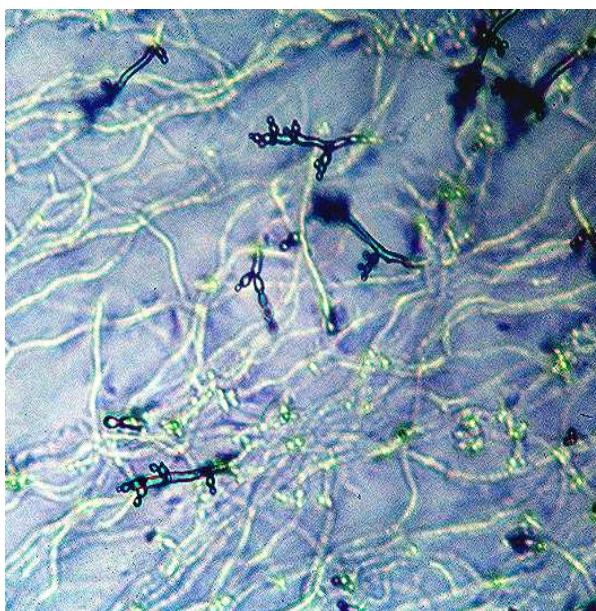


Figura 13. Vista al microscopio de *Trichosporon variabile*.

Fuente: Clayton, 2004

### 1.3.3 Bacterias.

La alteración más importante en la galleta es cuando se observa viscosa o filante, ocasionada por *Bacillus subtilis* ver Figura 14, que tiene una miga blanda, húmeda, untuosa, coloreada más o menos intensamente amarillo, o amarillo pardo que al cortarlo forma largos filamentos mucilaginosos y elásticos. Las piezas atacadas se transforman totalmente en una masa parda y untuosa (Muller, 1981).

Esta bacteria llega a la galleta con la harina, son extremadamente resistentes al calor y pueden sobrevivir en la miga durante la cocción al horno o panificación si la temperatura del centro de la pieza no sobrepasa los 100°C. Las esporas germinan con cierta rapidez formando pequeños bacilos que, en condiciones favorables, se multiplican también muy pronto ver Figura 15 (Muller, 1981).



Figura 14. Colonia típica de *Bacillus subtilis*.

Fuente: Atlas for Microbiology Laboratory. 2000.



Figura 15. Vista al microscopio de *Bacillus subtilis*.

Fuente: <http://www.cemera.pl/images/hlyiap.jpg>.

#### 1.4. Microorganismos indicadores de calidad

La denominación de microorganismos indicadores se aplica a cualquier grupo taxonómico, fisiológico o ecológico de bacterias, cuya presencia o ausencia proporcione evidencias indirectas de la presencia en la muestra de algún aspecto singular anterior. Frecuentemente se utilizan las bacterias intestinales, aunque otros grupos de microorganismos sirvan igualmente como indicadores en otras circunstancias (Forsythe, 2003).

El término de microorganismos indicadores lo sugirió Ingram en 1977 para toda bacteria cuya presencia señala la posible existencia en la muestra de un patógeno ecológicamente igual. Los microorganismos indicadores se emplean con más frecuencia para establecer la seguridad e higiene de los alimentos que para establecer su calidad (Forsythe, 2003).

Se puede emplear el número o el tipo de microorganismos presentes en o sobre un alimento para evaluar su seguridad microbiológica. Esta se determina por la presencia o ausencia de microorganismos patógenos o sus toxinas, por el número de patógenos, y por el control o destrucción esperado de estos agentes.

Los criterios microbiológicos se emplean para evaluar:

- ☞ La seguridad de un alimento
- ☞ La implementación de buenas prácticas de fabricación
- ☞ El mantenimiento de la calidad (vida útil) de ciertos productos perecederos.

A menudo la vida útil de un alimento perecedero viene determinada por el número de microorganismos presentes inicialmente. Como regla general, un alimento que contenga una gran población de microorganismos alterantes tendrá una vida útil más corta que el mismo alimento si contiene sólo unos pocos de microorganismos. Cuando se aplican criterios microbiológicos para garantizar la seguridad de los

alimentos, el objetivo último es reducir o eliminar un potencial riesgo de toxiinfección alimentaria (Doyle, 2001).

Las especificaciones microbiológicas son mostradas en la Tabla 1, donde se establecen los límites máximos permitidos de los parámetros más importantes relacionados tanto a la vida de anaquel como el contenido microbiológico y seguridad alimentaria para productos del tipo de las coyotas o galletas con relleno. Estos valores fueron adoptados como referencia de control y base del presente trabajo.

Tabla 1. Límites permitidos para galletas con relleno según la NOM –147-SSA1-1996.

ESPECIFICACIONES	LÍMITE MÁXIMO
Mesofílicos aerobios	5,000 UFC/g
Coliformes totales	20 UFC/g
Mohos	50 UFC/g
Levaduras	50 UFC/g

#### 1.4.1 Mesofílicos aerobios.

El recuento en placa de organismos mesofílicos se utiliza mucho como prueba de la calidad microbiológica de los alimentos a no ser que se sepa que contiene grandes cantidades de bacterias como consecuencia natural de su preparación (Adams y Moss, 1997).

El recuento de aerobios en placa (RAP) o recuento estándar en placa (REP) puede ser uno de los componentes de criterios microbiológicos para evaluar la calidad del producto cuando estos criterios se empleen para:

- ✓ Monitorizar alimentos para saber si cumplen los estándares o directrices establecidos por organismos reguladores.
- ✓ Monitorizar alimentos para examinar el cumplimiento de especificaciones de compra.

Modificando los parámetros de incubación o el medio de cultivo, el RAP puede emplearse para examinar preferentemente ciertos grupos de microorganismos como: termodúricos, los mesófilos, psicrófilos, termófilos, preteolíticos y lipolíticos. Estos pueden ser utilizados para indicar la posible presencia de microorganismos patógenos, indicar el valor comercial del alimento, indicar las condiciones higiénicas en que ha sido manejado el producto, predecir la vida de anaquel de un alimento, el estado del equipo o los utensilios, así como también para evaluar el perfil tiempo – temperatura durante el almacenamiento y distribución del producto (Doyle, 2001).

#### 1.4.2 Hongos y levaduras.

Una variedad de hongos microscópicos pueden contaminar y desarrollarse en los alimentos o simplemente permanecer en ellos y adquirir un especial significado desde el punto de vista sanitario. Los hongos y las levaduras son abundantes en el suelo, de manera que por contacto directo con la tierra o a través del polvo llegan fácilmente a los alimentos (Pelczar, 1993).

Durante el procesamiento y conservación de los alimentos, la exposición al polvo o la tierra se traduce por regla general en contaminación por hongos y levaduras, las plantas y los animales son también fuentes comunes de recuperación de estos microorganismos. Los hongos y levaduras prosperan en el equipo y utensilios mal saneados de manera que constituyen otra importante fuente de contaminación dentro de las plantas de alimentos. La piel del hombre sano es reservorio de una



variedad de hongos, algunos de los cuales son capaces de prosperar en los alimentos (Carpenter, 1984).

Los alimentos procesados por otra parte, sean de origen animal o vegetal muestran cifras cuyo nivel depende de tres tipos de factores:

- ✓ La exposición a las fuentes de contaminación: materias primas, ingredientes, tierra, aire, equipo, envases
- ✓ La oportunidad para su proliferación: composición del alimento, condiciones ambientales de temperatura y humedad, tiempo del almacenamiento
- ✓ Indicativos de un pobre saneamiento (Carpenter, 1984).

#### 1.4.3 Coliformes totales y fecales.

Los coliformes son bacterias gram negativas, de forma bacilar y anaerobias facultativas. Se conocen como grupo coli aerogenes. Sus criterios de identificación son: producción de gas a partir de la glucosa (y otros azúcares) y fermentación de la lactosa con producción de ácido y gas cuando se incuban a 48 horas a 35°C. El grupo coliforme comprende especies de los géneros de *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter* y en el se incluye a *E. coli*. Históricamente los coliformes se han usado como indicadores para establecer la contaminación fecal y por lo tanto la presencia de patógenos entéricos en el agua (Forsythe, 2003).

Sin embargo, dado que la mayoría de los coliformes se encuentran en el medio ambiente, su significado higiénico directo es muy escaso. Al destruirse fácilmente con el calor sirve para establecer las contaminaciones posteriores al termoprocesado (Forsythe, 2003).

*E. coli* es un componente natural de la flora intestinal del hombre y su presencia en el ambiente, o en los alimentos, generalmente implica algún antecedente de contaminación de origen fecal (Adams y Moss, 1997).

Los coliformes fecales; *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Edwardsiella*, son organismos que son capaces de crecer a temperaturas mas elevadas que la normal, esto es de 45-55°C y de aquí que los métodos ideados para su detección fuesen proyectados para proporcionar métodos rápidos y reproducibles para demostrar la presencia sin tener que utilizar las pruebas confirmadoras para esta especie (Adams y Moss, 1997).

Los recuentos de Enterobacteriaceae se utilizan más generalmente como un indicador de la calidad higiénica más que de la contaminación fecal y por lo tanto dicen más acerca de la calidad microbiológica general que acerca de los posibles riesgos de salud a los que expone el producto (Adams y Moss, 1997).

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Ubicación del experimento

Los análisis microbiológicos se realizaron en los laboratorios de la Dirección de Recursos Naturales del Instituto Tecnológico de Sonora, ubicados en la calle Chihuahua No. 818, en Cd. Obregón, Sonora.

### 2.2. Descripción de la muestra.

Las muestras consistieron en coyotas completas de 50 g cada una, las cuales fueron molidas y homogenizadas independientemente para su análisis utilizando vasos de licuadora previamente esterilizados. Como la empresa produce coyotas de diferentes sabores, en cada muestreo se incluyó una muestra de cada sabor, siendo estos cajeta, piloncillo y fresa. También se tomaron muestras de coyotas que tenían de dos a tres días de haber sido producidas, esto para determinar diferencias en su calidad microbiológica.

### 2.3. Recolección de la muestra.

Se realizó la compra de las muestras, como cualquier consumidor, se solicitaron dos coyotas de los diferentes sabores que elabora la empresa, al encargado de ventas, sólo se le dió una instrucción de colocarlas en las bolsas de plástico, según el sabor.

#### 2.4. Transporte de la muestra.

Las muestras se transportaron al laboratorio de microbiología para llevar a cabo los análisis dentro de las primeras 24 h, como lo determina la NOM-110-SSA1-1994.

#### 2.5. Fechas de los muestreos.

El periodo de muestreo se dividió en dos etapas: la primera correspondiente a los meses de Octubre de 2003 a Febrero de 2004. La segunda etapa fue en el mes de noviembre de 2004, ver Tabla 2.

En la Tabla 2 se presentan las fechas de los muestreos, los cuales fueron 9 en total. La empresa cuenta con coyotas de 3 sabores, cada uno de los cuales utiliza un ingrediente distinto como relleno, de ahí que en cada muestreo se incluyera una muestra de cada tipo o sabor de coyotas.

Tabla 2. Fechas de muestreo.

Muestreo	Etapas del experimento	Fecha
1	Fase 1	Octubre 15, 2003
2		Noviembre 09, 2003
3		Diciembre 15, 2003
4		Enero 07, 2004
5		Febrero 09, 2004
6	Fase 2	Noviembre 01, 2004
7		Noviembre 08, 2004
8		Noviembre 15, 2004
9		Noviembre 22, 2004

## 2.6 Análisis microbiológicos.

### 2.6.1 Cuenta total viable de mesofílicos aerobios (UFC/g) según la NOM-092-SSA1-1994.

El método utilizado es el de vaciado en placa. Basándose en la NOM-110-SSA1-1994, se lleva a cabo la preparación y dilución de la muestra. Primero se licuan 10 g, de la muestra en 90 ml de diluyente estéril para homogenizar la muestra, (dilución  $10^{-1}$ , 1:10), después con una pipeta estéril se tomó una alícuota de 1 ml y se transfirió a un tubo con 9 ml de diluyente, se homogenizó y ésta fue la dilución  $10^{-2}$ , 1:100. Este mismo proceso se repitió hasta obtener una dilución 1:1000.

Luego se coloca 1 ml de cada dilución en cajas petri estériles. Posteriormente se agregaron de 15 a 20 ml de agar Cuenta Estándar previamente esterilizado y después se agitaron suavemente por rotación para distribuir adecuadamente la muestra en el medio de cultivo. Este análisis se realizó por duplicado para obtener resultados más confiables.

Una vez solidificado el medio, las cajas se incuban a 35-37°C por un periodo de 24-48 h y después se realiza un conteo en el contador de colonias Quebec. Este conteo se expresa en Unidades Formadoras Colonias (UFC), multiplicando el número de colonias por la inversa de la dilución correspondiente. Se seleccionó la dilución en donde la cantidad de colonias observada se encontró dentro del margen de 30 a 300, de acuerdo a lo especificado en esta norma.

### 2.6.2 Coliformes totales.

Se realiza por la técnica número más probable (NMP), según la NOM-112-SSA1-994. Prueba presuntiva. A partir de las diluciones  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ , se inocula con 1 ml de cada dilución, en tubos con caldo lauril sulfato de triptosa por triplicado los cuales tenían campanas de Durham, para observar la posible presencia de gas. Después se incuban a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  de 24 a 48 h. Se verificó que antes de incubar los tubos, no hubiera burbujas para evitar confusión en los resultados. Se considera prueba positiva cuando hay turbidez y gas en la campana.

Prueba confirmativa. Se agitan los tubos de caldo lauril sulfato triptosa que resultaron positivos en la prueba presuntiva. Luego, se transfieren de 2 a 3 asadas de cada tubo a otros tubos con caldo lactosa bilis verde brillante que tienen campana de Durham. Se incuban los tubos a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 48 h. Se examinan los tubos a las 24 h y se observa si hay producción de gas y turbidez. Si no lo hay, se siguen incubando hasta las 48 h. Transcurrido el tiempo, según el número de tubos positivos se determinó el NMP en tablas.

### 2.6.3 Coliformes fecales por NMP.

Prueba presuntiva. Se realiza de igual manera que para Coliformes totales.

Prueba confirmativa. Se agitan los tubos de caldo lauril sulfato triptosa que resultan positivos de la prueba presuntiva y se transfieren de 2 a 3 asadas de cada tubo a otros con 10 ml de caldo EC (Eijkman) con sus respectivas campanas. Después se incuban a  $44.5^{\circ}\text{C}$  en baño de agua durante 18 a 24 h. Se observa a las 24 h. La presencia de gas, en cualquier cantidad, dentro del tiempo incubación hacia la prueba positiva. Se reportan los resultados: número más probable (NMP) de coliformes fecales por gramo de muestra.

#### 2.6.4 Determinación de mohos y levaduras (UFC/g) según la NOM-111-SSA1-1994

Se toma 1 ml de las diluciones  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  se coloca en las cajas petri estériles. Posteriormente se agrega de 15 a 20 ml de agar Dextrosa de papa acidificado con ácido tartárico al 10% fundido el cual se mantuvo a una temperatura de  $45^{\circ}\text{C}$  en baño de agua. Este análisis se realizó por duplicado. Se homogeniza y se deja solidificar. Se incuban las placas a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 72 h.

Se realiza el recuento de colonias a las 24, 48 y 72 h, seleccionando la dilución donde se encuentren entre 20 y 250 UFC. Se multiplica por la inversa de la dilución e informar: Unidades Formadoras de Colonias de mohos y levaduras.

### III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Resultados de los análisis microbiológicos.

##### 3.1.1. Cuenta total viable de microorganismos mesofílicos aerobios.

Los resultados de cuenta de microorganismos mesofílicos aerobios para la primera fase del experimento, se muestran en la Tabla 3. El 95% de las muestras analizadas cumplen con los requisitos establecidos por la norma. Sólo en el caso de las coyotas con relleno de fresa una sola muestra resultó fuera de las especificaciones microbiológicas. En la segunda fase del experimento se encontró que la coyota con relleno de piloncillo sobrepasó el límite microbiológico con 7000 UFC/g, y de cajeta en una ocasión presentó 7900 UFC/g valores por encima de las especificaciones microbiológicas (muestreo número 7), dando como resultado un 87.5% de cumplimiento.

Las coyotas al salir del horno es sometido a un proceso de pérdida de calor, el objetivo es alcanzar la temperatura adecuada y podría suceder que se contamine microbiológicamente durante el mismo, pasando a contener unos niveles no deseable que pueden originar un riesgo no aceptable en el producto (Guía para la aplicación de un programa de HACCP [http://www.hvsa.es/documentos/Guia\\_HACCP\\_Panaderia\\_y\\_Pasteleria](http://www.hvsa.es/documentos/Guia_HACCP_Panaderia_y_Pasteleria)).



Esto nos indica que el proceso de producción tuvo ciertas deficiencias en cuanto a buenas prácticas de manufactura, por lo cual se necesita llevar un monitoreo más estricto para que no se salgan de los límites permitidos y establecidos por la norma. La presencia de microorganismos en la coyota puede ser causada por la bacteria *Bacillus subtilis*, ya que se encuentra en la harina y puede sobrevivir a temperaturas altas (Muller, 1981).

Tabla 3. Resultados obtenidos de la evaluación en la calidad sanitaria de coyotas para mesofílicos aerobios (UFC/g). El conteo se realizó a las 48 horas después del llevar a cabo el análisis.

No. de muestreo	Periodo	Muestra							
		Piloncillo	Cumple	Cajeta	Cumple	Fresa	Cumple	Días	Cumple
1	1	300	Si	4200	Si	8800	No	1500	Si
2		550	Si	130	Si	580	Si	240	Si
3		570	Si	310	Si	2370	Si	940	Si
4		450	Si	540	Si	370	Si	NM	N/A
5		490	Si	410	Si	590	Si	C	N/A
% de cumplimiento:			100%		100%		80%		100%
% de cumplimiento del periodo: 95%									
6	2	640	Si	120	Si	150	Si	210	Si
7		7000	No	7900	No	420	Si	2580	Si
8		90	Si	170	Si	200	Si	940	Si
9		610	No	180	Si	110	Si	310	Si
% de cumplimiento:			75%		75%		100%		100%
% de cumplimiento del periodo: 87.5%									

\* NM= No Muestreado, \* C= Contaminado, \* N/A= No aplica. Especificaciones NOM-147-SSA1-1996: Mesofílicos aerobios <5000 UFC/g.

### 3.1.2. Recuento de mohos y levaduras.

Los resultados al inicio del experimento reflejaron deficiencias en las condiciones sanitarias del proceso (Tabla 4). Durante el primer periodo del mismo, los análisis demuestran que prácticamente el 20% de las muestras analizadas cumple con las especificaciones de la NOM-147-SSA1-1996. Lo que coinciden las altas cantidades de mohos con los resultados de Mungia, 2003.

En contraste, en la segunda fase del experimento en donde el porcentaje de cumplimiento fue de 87.5%, sólo la muestra de piloncillo en el muestreo 6 presentó 70 UFC/g y el muestreo 7 obtuvo 630 UFC/g, por lo que no cumplieron con las especificaciones microbiológicas ya que la norma indica <50 UFC/g.

Los hongos y levaduras constituyen teóricamente la principal fuente de contaminación en galletas por la baja actividad de agua que tiene de 0.1, por lo que es más difícil para bacterias ya que estas se desarrollan en 0.90 de Aw (Badui 1993). También la presencia de estos microorganismos en algunos alimentos es indicativa de prácticas higiénicas defectuosas durante la obtención o el almacenamiento, también representan un riesgo muy importante para la salud por el desarrollo de sus micotoxinas; por ejemplo, las producidas por hongos del genero *Fussarium*, a las cuales se les denomina Fuminisinas, y se ha demostrado que tienen fuertes efectos carcinogénicos en animales y ser humano ( Jay, 2002).

La contaminación ambiental puede incrementar el factor de riesgo de un producto, dado que generalmente se enfrían con aire ambiente que procede de la calle y éste se encuentra contaminado. Lo que aún es más peligroso es que esta contaminación varía de un día a otro (Guía para la aplicación de un programa de HACCP) [http://www.hvsa.es/documentos/Guia\\_HACCP\\_Panaderia\\_y\\_Pasteleria](http://www.hvsa.es/documentos/Guia_HACCP_Panaderia_y_Pasteleria)).

Este incremento se debió a las mejoras que se realizaron en el proceso de producción que Mungia 2003, sugirió al término de su investigación, la capacitación del personal, el mantenimiento del equipo, lavar y desinfectar los utensilios, eliminar corrientes de aire en el área de proceso, contar con un área de enfriado y empackado, tener un control de plagas.

Tabla 4. Resultados obtenidos de la evaluación en la calidad sanitaria de coyotas para mohos y levaduras (UFC/g). El conteo se hizo a las 48 horas después del llevar a cabo el análisis.

No. de muestreo	Periodo	Muestra							
		Piloncillo	Cumple	Cajeta	Cumple	Fresa	Cumple	Días	Cumple
1	1	0	Si	0	Si	1000	No	100	No
2		500	No	130	No	500	No	700	No
3		350	No	640	No	170	No	330	No
4		90	No	20	Si	0	Si	*NM	N/A
5		330	No	170	No	110	No	70	No
% de cumplimiento:			20%		40%		20%		0%
% de cumplimiento del periodo: 20%									
6	2	70	No	0	Si	0	Si	10	Si
7		630	No	40	Si	0	Si	30	Si
8		30	Si	20	Si	50	Si	0	Si
9		30	Si	30	Si	20	Si	30	Si
% de cumplimiento:			50%		100%		100%		100%
% de cumplimiento del periodo: 87.5%									

\* NM= No Muestreado, \* N/A= No aplica. Especificaciones NOM-147-SSA1-1996: mohos y levaduras <50 UFC/g.

### 3.1.3 NMP de coliformes totales y fecales.

En el presente estudio se encontró que el 100% de las muestras analizadas no presentaron coliformes totales ni fecales, cumpliendo así perfectamente con este aspecto de la Norma Oficial Mexicana. Los tubos no presentaron turbidez ni gas en la campana de Durham, lo que nos indica que no presentó contaminación fecal lo cual constituye un buen indicador del cumplimiento de buenas prácticas de higiene tanto en la preparación de las coyotas como en su almacenamiento.

Un aspecto muy importante relacionado a la calidad sanitaria del alimento y a las prácticas de higiene es la presencia de coliformes en los alimentos. Estos microorganismos están estrechamente relacionados a la contaminación proveniente de las heces fecales, debido a que se encuentran normalmente en el tracto digestivo de los mismos, y son expulsadas al medio ambiente a través de ese vehículo heces (Fernández, 1993).

La contaminación por estos microorganismos en las coyotas se daría después del proceso de horneado ya que no resisten temperaturas mayores a 120 °C.

## CONCLUSIONES

- ❖ La mayor parte de los análisis mostraron que la cuenta total viable es satisfactoria a lo largo del experimento, con un porcentaje de cumplimiento de la norma durante el primer periodo del 95%, y durante el segundo de 87.5%.
- ❖ Durante la primera fase del experimento las coyotas presentaron un 20% cumplimiento con los estándares máximos permitidos de hongos y levaduras. Dicho porcentaje sufrió un incremento del 87.5%, debido a implementación de prácticas de manufactura e higiene.
- ❖ No se detectó la presencia de coliformes totales y fecales, por lo que el 100% de las muestras indica que se trata de lotes producidos bajo buenas condiciones sanitarias en este sentido.
- ❖ Al final del experimento, se concluye desde el punto de vista microbiológico y por el bajo porcentaje de incumplimiento a las normas de sanidad, que el riesgo al consumir este alimento es muy bajo. Por lo tanto es apto para consumo humano.

## RECOMENDACIONES

- ❖ Crear un hábito y conciencia en los trabajadores de lo importante que es el limpiar muy bien el lugar de trabajo, desde utensilios, equipos de trabajo, lugar y sobre todo la higiene personal.
- ❖ Realizar monitoreos cada mes para verificar el control de la contaminación microbiana causada, por malas prácticas de higiene.
- ❖ Se deben seguir observando estrictos controles sanitarios en el proceso de fabricación del producto.
- ❖ Se recomienda realizar estudios durante periodos más amplios, comprendiendo tanto los meses de verano como de invierno, para atender a los cambios de temperatura que están estrechamente relacionados a la proliferación microbiana en los alimentos.

## LITERATURA CITADA

Adams M.R. y Moss M.O. 1997. Microbiología de los alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España. Pag. 230, 381 – 383.

Asociación Mexicana de Industriales de Galletas y Pastas (AMEXIGAPA). México. [www.amexigapa.com.mx/2niv/galletas/2n5](http://www.amexigapa.com.mx/2niv/galletas/2n5).

Atlas for the Microbiology Laboratory. 2000. Exercises for the Microbiology. 2<sup>nd</sup>. Ed., Leboffe and Pierce. <http://www.austin.cc.tx.us/microbugz/images>

Badui Salvador. 1993. Química de los alimentos. Editorial Pearson Educación. Longman de Mexico Editores, S.A. de C.V. Tercera edición. México D. F. Pag. 32

Calvel R. 1994. La Panadería moderna. Ed. AméricaLee, Buenos Aires, Argentina.

Carpenter Philip. 1984. Microbiología. 4ta edición. Editorial Interamericana, S.A. México, D.F. Pag. 237-240.

Cheftel J.C., Cuq. J.L. 1989. Proteínas alimentarias. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. Pag. 235,238.

Clayton Mike. 2004. Universidad Wisconsin Madison- Dept of botany. <http://botit.botany.wisc.edu/images/332/Ascomycota/Hemiascomycetes/>

Contreras Manuel. 2004. XXII Asamblea. Asociación Latinoamericana de Industriales Molineros. México, D.F. [www.harina.org/trigo.htm](http://www.harina.org/trigo.htm)

Diane R., Hooper W., Greenwood M. 2000. Microbiología Moderna de los Alimentos. Editorial Acribia. S. A. Zaragoza España. Pag. 27.

Diario Oficial de la Federación NOM-092-SSA1-1994. Bienes Y Servicios. Método para el recuento de Organismos Mesofílicos Aerobios. México D.F. [www.salud.gob.mx](http://www.salud.gob.mx).

Diario Oficial de la Federación NOM-109-SSA1-1994. Bienes Y Servicios. Procedimiento para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. México D.F. [www.salud.gob.mx](http://www.salud.gob.mx)

Diario Oficial de la Federación NOM-110-SSA1-1994. Bienes Y Servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. México D.F. [www.salud.gob.mx](http://www.salud.gob.mx)

Diario Oficial de la Federación NOM-111-SSA1-1994. Bienes Y Servicios. Método para la cuenta de Mohos y levaduras en Alimentos. México D.F. [www.salud.gob.mx](http://www.salud.gob.mx)

Diario Oficial de la Federación NOM-112-SSA1-1994. Bienes Y Servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica numero más probable. México D.F. [www.salud.gob.mx](http://www.salud.gob.mx).

Diario Oficial de la Federación NOM-147-SSA1-1994. Bienes Y Servicios. Cereales, Sémolas o semolinas. Alimentos a base de cereales, de semillas comestibles. Productos de panificación disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. México D.F. [www.salud.gob.mx](http://www.salud.gob.mx).



Doyle Michael. 2001. Microbiología de los Alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España. Pag. 69, 74 – 76.

Ellis David. 2005. Mycology Online. The University of Adelaide. Australia.

Fernández Elizabeth. Manual de laboratorio de microbiología. Segunda edición. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. Pag. 37,40-50

Forsythe Stephen. 2203. Alimentos Seguros Microbiología. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza España. Pag. 140 – 142.

Frangne R., Adrian J. 1990. Paciencia de los alimentos de la A a la Z. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza España. Pag. 172, 257.

Frazier y Westhoff. 2000. Microbiología de los alimentos. 4 ta edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España. Pag. 239

Guía para la aplicación de un programa de HACCP. En una industria de derivados de harina, panificación, bollería, pastelería.  
[http://www.hvsa.es/documentos/Guia\\_HACCP\\_Panaderia\\_y\\_Pasteleria](http://www.hvsa.es/documentos/Guia_HACCP_Panaderia_y_Pasteleria).

Ingredientes y Diagrama de flujo para elaborar las coyotas.  
[www.gob.mx/portal/runscript.asp](http://www.gob.mx/portal/runscript.asp)

Jarger M., Lück E. 2000. Conservación química de los alimentos. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza España. Pag. 80, 157, 160.

Jay James. 2002. Microbiología moderna de los Alimentos. 4ta Edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza España. Pag. 158.

Jonson E.M., Philpot C.M. 1996. <http://www.pollen.utulsa.edu/Spores/Aspergillus>.

Manley Duncan. 1989. Tecnología de la industria galletera. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza España. Pag. VII,19, 23, 35,120-123,419.

Manuales para la educación agropecuaria. 1999. Trigo, cebada, avena. 5ta edición. Editorial Trillas. México D.F. Pag. 9-11.

Mazza G. 2000. Alimentos funcionales. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza España. Pag. 43.

Muller Gunther. 1981. Microbiología de los Vegetales. Editorial Acribia. S. A. Zaragoza España. Pag. 137, 138.

Mungia Arely. 2003. (Tesis) Diagnostico sanitario de superficies vivas e inertes del proceso de producción de coyotas. Instituto Tecnológico de Sonora. Cd. Obregón, Sonora.

Oppermann Stefan. 2003. enius AG-Partner Fur Ingenieur-und Laborleistungen.  
<http://schimmel-schimmelpilze.de/schimmelpilz-bilder/rizopus-stolonifer.jpg>.  
<http://www.schimmel-schimmelpilze.de-schimmelpiz-aspergilus.htm>.

Pelczar, Reid, Chan. 1993. Microbiología. 4ta edición. Editorial McGraw-Hill. México D.F. Pag. 261-265.

Pitocchelli, Jay. 2004. Anselm college.  
<http://www.anselm.edu/homepage/jpitocch/genbios/31-14b-Penicillium>.

Pitt, John. 2000. <http://www.dehs.umn.edu/graphics/fungus/penicillium/expansum>.

Quaglia Giovanni. 1991. Ciencia y Tecnología de la Panificación. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España. Pag. 202, 237.

Raisman J., González A. 2003. Hipertextos del área de la biología. Universidad del Noroeste. Republica de Argentina. <http://www.biologia.edu.ar>.

Shouthgate David. 1992. 3ra edición. Editorial Acribia. S. A. Zaragoza España. Pag. 27-30.

Tapia García. 2001. [http://www.mold.ph/fusarium\\_files/image](http://www.mold.ph/fusarium_files/image).

*Paginas de internet:*

<http://www.coyotaslulu.com>

<http://www.cemera.pl/images/hlyiap.jpg>.

<http://www.kabi.jp/html/jp/osennrei2>.



