



Departamento de Posgrados

“Bioconservación de embutidos crudos mediante el uso de *Staphylococcus carnosus* y *Lactobacillus plantarum* como cultivos protectores”

Trabajo de graduación previo la obtención del título de:

“Magister en Gestión de la Calidad y Seguridad Alimentaria”

Autor: Javier Moscoso Calle

Director: Claudio Sánchez Jáuregui

Cuenca – Ecuador

2017

DEDICATORIA

Por la fortaleza, empuje y cariño.....Juanita.

Por la sonrisa y alegría.....Javi, Rafa y Marti.

Por el apoyo incondicional.....Papi y Mami.

AGRADECIMIENTOS

Al Señor Jesús por iluminar y bendecir toda mi vida.

Al Ing. Claudio Sánchez, Director del presente trabajo, por brindarme su guía,
conocimiento y amistad

A Don Lautaro Jetón, Presidente de ITALIMENTOS CIA. LTDA por apoyarme
íntegramente a lo largo de la maestría.

A los Ingenieros María Fernanda Rosales y Diego Montero por su apoyo y colaboración
para llevar a cabo la parte experimental.

A mis compañeros Francisco, Miriam y Carlos por su total soporte.

RESUMEN

Esta investigación estudió la Bioconservación de embutidos crudos mediante el uso de *Staphylococcus carnosus* y *Lactobacillus plantarum* como cultivos protectores.

Los resultados demostraron que el pH, no tuvo ninguna variación significativa y que el mecanismo de control no es la producción de ácido. Los recuentos de *E. coli*, desde su elaboración hasta el día 15, mantuvieron un rango esperado, experimentando decrecimientos en los tres tratamientos no significativos, resaltando que el T2 fue el de mejor resultados. Los recuentos de los cultivos protectores, tuvieron un decrecimiento significativo desde su elaboración hasta el día 15, sugiriendo que el accionar del *L. plantarum* puede ser la formación de bacteriocinas, y del *S. carnosus*, su morfología y habitualidad en la matriz cárnica, se cree que es por competencia nutritiva.

El uso del cultivo protector es viable, en los tres casos, se cumplió la vida útil establecida y organolépticamente se debe realizar la respectiva validación.,

PALABRAS CLAVE:

Bionconservación, cultivo protector, *E. coli*, *Staphylococcus carnosus*, *Lactobacillus plantarum*, salchicha de freír.

ABSTRACT

This research studied the bio-conservation of uncooked sausages through the use of *Staphylococcus carnosus* and *Lactobacillus plantarum* as protective cultures. The results showed that there wasn't any significant variation in the pH, and that acid production is not the control mechanism. The counts of *E. coli* from their elaboration until day 15 maintained an expected range, experiencing decreases in the three non-significant treatments, highlighting that T2 was the one with the best results. The counts of the protective cultures had a significant decrease since its elaboration until day 15, suggesting that *L. plantarum* can act as the formation of *bacteriocins* and of *S. carnosus*. It is believed that its morphology and habitually in the meat matrix is due to nutritional competition. The use of protective culture is viable; in all three cases the established useful life has been fulfilled and the respective validation must be carried out organoleptically.

KEYWORDS: Bio-conservation, Protective Culture, *E. coli*, *Staphylococcus carnosus*, *Lactobacillus plantarum*, Frying Sausage.

INDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
INDICE DE CONTENIDO	vi
INDICE DE TABLAS	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
1. INTRODUCCION	1
1.1. Bioconservación en alimentos	2
1.2. Bioconservación en la carne y productos cárnicos	2
1.3. Bacterias usadas como protectoras	3
1.3.1. <i>Lactobacillus plantarum</i>	4
1.3.2. <i>Staphylococcus carnosus</i>	4
1.4. <i>Escherichia coli</i>	5
1.5. Objetivos e Hipótesis del trabajo de investigación	5
1.5.1. Objetivo general	6
1.5.2. Objetivos específicos	6
1.5.3. Hipótesis de la investigación experimental	6
2. CAPÍTULO 1: MATERIALES Y MÉTODO	7
2.1. Ubicación de lugar de trabajo	7
2.2. Materias Primas	7
2.3. Materiales y Métodos	7
2.4. Metodología de trabajo	7
2.5. Análisis físico químico	8
2.6. Análisis microbiológico	8
2.7. Análisis experimental	8
2.8. Análisis estadístico	8
3. CAPÍTULO 2: RESULTADOS	9

3.1. Características de la materia prima cárnica.....	9
3.2. Característica del proceso de elaboración de la Salchicha de Freír	10
3.2.1. Comportamiento del pH en la elaboración y vida útil	10
3.2.2. Comportamiento de <i>E. coli</i> en las etapas de elaboración y en el tiempo de vida útil en los tres tratamientos.....	11
3.2.3. Comportamiento del cultivo protector vs. <i>E. coli</i> en el tiempo de vida útil	13
4. CAPÍTULO 3: DISCUSIÓN	15
5. CONCLUSION	19
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	20
7. ANEXOS	22
ANEXO I.....	23
ANEXO II.....	26
ANEXO III.....	31
ANEXO IV	36
ANEXO V	38
ANEXO VI	40
ANEXO VII	41
ANEXO VIII	42
ANEXO IX	43
ANEXO X	44
ANEXO XI	51
ANEXO XII	52
ANEXO XIII	53

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de pH de la materia prima.....	9
Tabla 2. Valores de log ufc/g de <i>E. coli</i> de la materia prima	9
Tabla 3. Valores de pH registrados durante la elaboración y vida útil de la Salchicha de Freír	10
Tabla 4. Comportamiento del Recuento <i>E. coli</i> (log ufc/g), en la fabricación y almacenaje de la Salchicha de freír	12
Tabla 5. Comportamiento (log ufc/g) bacterias cultivo protector vs <i>E. coli</i> en la vida útil	13

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución de pH en la elaboración y tiempo de vida	11
Figura 2. . Evolución de los recuentos de <i>E. coli</i> (log ufc/g) en la elaboración y tiempo de vida	12
Figura 3. Comportamiento log ufc/g bacterias cultivo protector vs <i>E. coli</i> en la vida útil.....	14

Javier Moscoso Calle

Trabajo de graduación

Director: Ing Claudio Sánchez

Diciembre 2016

**“BIOCONSERVACION DE EMBUTIDOS CRUDOS MEDIANTE EL USO DE
Staphylococcus carnosus Y *Lactobacillus plantarum* COMO CULTIVOS
PROTECTORES”**

1. INTRODUCCION

La carne es un alimento importante en la dieta humana, debido a su alto contenido de proteína. El total de nitrógeno contenido en el musculo es de aproximadamente del 95% y el 5% restante está formado de péptidos, amino ácidos y otros compuestos más sencillos. Estas proteínas son consideradas de alta calidad y valor nutricional, ya que contienen diferentes tipos de amino ácidos esenciales, siendo fundamentales para el desarrollo y crecimiento humano. (Varnam y Sutherland, 1998).

Las salchichas frescas es un tipo de embutido de carne procesada de fácil elaboración y es un producto que podría no contener sal de cura (nitrito de sodio) y, además que no tenga tratamiento térmico. Este tipo de salchichas deben mantenerse refrigerado y ser cocinados antes de su consumo. (Hui et al 2012)

Las características de los productos cárnicos y avícolas frescos (rica en nutrientes, pH por encima de 5,0 y alta aw), fomenta el crecimiento de microorganismos deteriorativos y patógenos, además que, si el método de conservación no es el adecuado o su tratamiento térmico ha sido insuficiente, representan un riesgo de enfermedades transmitidas por los alimentos. Para estos casos, los métodos de conservación apuntan a modificar las propiedades físicas, químicas y/o biológicas con el fin de extender su vida útil y mejorar las condiciones sanitarias de los productos. (Hui et al 2012).

1.1. Bioconservación en alimentos

La bioconservación o biocontrol, se refiere a la utilización de una microbiota natural o controlada, o que sus productos antibacterianos sirven para extender la vida útil y mejora la seguridad de los alimentos. (Stiles 1996, citado por Gálvez et al 2014).

Se han desarrollado técnicas modernas de bioconservación de los alimentos, sobresaliendo el uso de las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) como una alternativa viable para reducir el uso de químicos alimentarios. En la actualidad las BAL, ostentan un papel principal en la preservación y producción de alimentos sanos, como: vegetales fermentados como el chucrut, lácteos fermentados como el kéfir y salchichas fermentadas, etc (Rahman, 2007).

Los autores Guerrero et al (1995), Montel y Talon, (1993), citados por Minor et al (2002), comentan que los estudios realizados en la producción ácido láctico vía fermentativa en la carne, sea enfocado dos aspectos principales: inhibir la flora patógena y de descomposición como *E. coli*, *Enterobacteriaceae*, *Serratia spp*, *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas putida*, entre otras. Por otro lado, las LAB posee una gran cantidad de métodos de competición bacteriana con otros microorganismos, siendo el más eficaz la producción de ácido láctico y consecuentemente la baja de pH a niveles donde otros microorganismos competidores ya no pueden crecer Rahman (2007). Por otro lado, se considera que estas bacterias también tienen la capacidad de producir peróxido de hidrógeno, además poseen un poder inhibitorio sobre las bacterias esporuladas. Los principales mecanismos de antagonismo microbiano de las BAL son, la competencia de nutrientes y la formación de ácido láctico y acético. (Lindgren y Dobrogosz 1990).

1.2. Bioconservación en la carne y productos cárnicos

Los cultivos usados en la bioconservación, son conocidos como protectores, ya que se utilizan principalmente para inhibir microorganismos patógenos y deteriorativos, consecuentemente prolongan la vida útil de los productos cárnicos no fermentados; además responsables del crecimiento y producción de bacteriocinas durante el almacenamiento refrigerado y no refrigerado. En condiciones ideales de almacenamiento, deben tener un efecto neutro sobre las propiedades sensoriales, mientras en situaciones no favorables por temperatura, este cultivo protector actúa como cepa predominante, lo que garantiza la inhibición en el crecimiento de bacterias patógenas. (Toldrá et al 2015).

Se considera que los microorganismos a menudo viven en ecosistemas complejos en los que deben interactuar con los factores bióticos y los componentes abióticos de su medio

ambiente, por lo que, las poblaciones de las bacterias deben competir por espacio y nutrientes con el fin de sobrevivir. Los mismos autores indican que se han desarrollado diferentes mecanismos de sobrevivencia microbiana siendo: competencia nutritiva, especialización metabólica, competencia de lugar y la diferenciación celular. Las bacterias pueden liberar una variedad de sustancias antimicrobianas como subproductos de su actividad metabólica normal. Además pueden producir actividades metabólicas con especificaciones codificadas genéticamente, así como péptidos antimicrobianos a partir de bacterias ácidos lácticas (LAB), siendo consideradas como conservantes naturales. (Gálvez et al 2014).

La bioconservación en los alimentos y específicamente en cárnicos, es aplicada por cuatro métodos básicos: a) añadiendo un cultivo puro de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) viables productoras de bacteriocina; b) añadiendo BAL mesófilas como una protección contra la variación de la temperatura de almacenamiento; c) añadiendo preparaciones de bacteriocinas puras; y, d) adicionando sustancias antagónicas puras o semipuras (Vásquez et al 2009).

1.3. Bacterias usadas como protectoras

Los cultivos protectores, son microorganismos que pueden encontrarse en un producto alimenticio como constituyente nativo o también pueden ser añadidos, debiendo tener un efecto positivo en la conservación del alimento. Además, dichas bacterias deben poseer las siguientes propiedades: a) no presentar riesgos para la salud; b) proporcionar efectos beneficiosos al producto; c) no tendrá un impacto negativo sobre las propiedades sensoriales del producto; y, d) servir como indicadores; siendo las BAL el grupo más grande e importante que se sitúa en esta categoría (Jay et al 2005). Por otro lado, comentan que el crecimiento de las bacterias patógenas puede ser reducido cuando se aplican cultivos LAB en la superficie de los productos cárnicos no fermentados como salchichas, carnes cortadas y molidas (Gesien *et al.* 1991).

Las cepas de LAB productoras de bacteriocinas, pueden usarse directamente como cultivo starter o en combinación con otro cultivo starter como iniciadores o únicamente como cultivos protectores. Cuando se usan cepas bacteriocinogénicas como cultivos starter deben ser capaces de manera óptima de conducir el proceso de fermentación. Cuando se utilizan como cultivo adjunto, deben producir suficiente cantidad de bacteriocinas para su protección y no se espera que aporten a la fermentación, además de no interferir con la función del cultivo iniciador, pero si resistente a él. (Toldrá et al 2015).

1.3.1. *Lactobacillus plantarum*

Dentro de las bacterias ácido lácticas, las especies de *Lactobacillus* son las predominantes en las fermentaciones naturales de los embutidos. Las especies más comúnmente encontradas son: *Lb. bavaricus*, *Lb. curvatus*, *Lb. farciminis*, *Lb. plantarum*, y *Lb. sake*. (Varnam y Sutherfrland, 1998).

Al género *Lactobacillus* de acuerdo al tipo de fermentación, siendo: Grupo 1. Especies homofermentativas obligadas (*L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, etc), conocidas además como las termobacterias y no fermentan las pentosas. Grupo 2. Especies heterofermentativas facultativas (*L. casei*, *L. plantarum*, *sakei*, etc), que fermentan las pentosas. Grupo 3. Especies heterofermentativas obligadas que incluyen *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. reuteri*, entre otras que producen CO₂ a partir de la glucosa. En general los lactobacillus se pueden producir hasta en un pH de 4 en los alimentos que tienen un hidrato de carbono fermentable y pudiendo crecer hasta un pH de 7.1 (Jay et al 2005). Por otro lado, Montville et al (1987), señala que el *Lactobacillus plantarum*, es heterofermentativa facultativa, ya que fermenta la glucosa y lactosa casi en su totalidad produciendo ácido láctico, pero además produce trazas de acetoína, diacetilo y 2-3 butanodiol, relativa insensibilidad al ataque bacteriófago, tolerancia a pH bajos, al calor, nitritos, sal; generalmente conocida como un ingrediente seguro para el uso en los alimentos y además tienen la capacidad de fermentar más de 20 azúcares diferentes.

La mayoría de las bacteriocinas identificadas producidas por BAL asociadas a la carne y productos cárnicos pertenecen a la clase I y II, identificado para *Lactobacillus plantarum* la plantaricina A, clase IId. (Gálvez et al 2014).

1.3.2. *Staphylococcus carnosus*

Los *Staphylococcus* es un género importante dentro de la familia de las micrococáceas, siendo el *Staphylococcus aureus* la más significativa de este género, ya que es una bacteria patógena muy peligrosa en los alimentos. Otras especies de *Staphylococcus*, es *Staph. xylosus* y el *Staph. carnosus* que generalmente son usados como cultivos starter en la fabricación de salami. (Feiner, 2006). Por otro lado, por razones de estabilidad de color y desarrollo de sabor, se utilizan bacterias GCC (cocos, gram positivos, catalasa positiva) como cultivos starter en la fabricación de salchichas maduradas. Los *Staphylococcus* no patógenos son cuagulasa negativa como *Staph. carnosus*, *Staph. xylosus* y *Kocuria varians*. Su función principal es el de convertir el nitrato en nitrito de sodio, mediante la actividad nitrato reductasa, además producen catalasa, que elimina el color no deseado por la formación de peróxido de hidrógeno que puede ocasionarse por las BAL no starter. (Tarté, 2009),

La mayoría de cultivos starters comerciales para productos cárnicos, contienen bacterias ácido lácticas y *Staph. carnosus*, es esencial que dichas bacterias sean tolerables una con otra o, preferiblemente, crecer en simbiosis (Varnam y Sutherland 1998),

1.4. *Escherichia coli*

La *Escherichia coli*, también conocida como *E. coli* es una bacteria que se encuentra principalmente en el sistema digestivo de los seres humanos y animales de sangre caliente. Debido a su alta presencia en el intestino, *E. coli* se utiliza como indicador principal para detectar y medir la contaminación fecal en la evaluación de la inocuidad de los alimentos y agua. (FAO, 2011)

Escherichia es un género de la familia de las Enterobacteriaceae y *E. coli* es un tipo de especie de este género. Gram (-), cadena corta no esporulada. Genéticamente *E. coli* está muy estrechamente relacionado con el género *Shigella*, característica propia de fermentar la lactosa y bioquímicamente mucho más activo que la *Shigella*. (Adam y Moss, 2008). Los mismos autores, también detallan que *E. coli* es una mesófila típica que crece entre 7 a 50°C, siendo su temperatura óptima 37°C, sin embargo, algunos estudios han reportado que algunas cepas crecen a temperaturas bajas como 4°C y consecuentemente pueden sobrevivir en almacenamiento refrigerado o congelado durante periodos prolongados, además resiste tratamientos térmicos con un valor D 60°C por 0,1 minutos; su pH óptimo es cercano a neutro, pero existiendo actividad hasta pH 4.4 y la aw mínima es de 0,95. Por otro lado, detallan que el peróxido de hidrógeno al 2% redujo la presencia de *E. coli* de 4 ciclos logarítmicos y 3 ciclos logarítmicos de *S. Enteritidis* sin afectar la calidad sensorial de las hojas de lechuga. (Jay *et al.* (2005),

1.5. Objetivos e Hipótesis del trabajo de investigación

Se han identificado serios problemas relacionados directamente con las limitadas formas de conservación de los embutidos frescos, principalmente la falta de refrigeración y sumando al hecho de la continua exigencia de disminuir o prohibir cada vez más el uso de conservantes y aditivos químicos en los alimentos, debido a diferentes efectos adversos que pueden causar a la salud del consumidor. Esto obliga a la búsqueda de metodologías alternativas para conservar los alimentos.

1.5.1. Objetivo General

Estudiar la capacidad como bioconservante de los cultivos protectores *Staphylococcus carnosus* y *Lactobacillus plantarum* en la Salchicha de freír en sustitución del conservante químico usado actualmente.

1.5.2. Objetivos Específicos

- Evaluar el proceso de acidificación, mediante el control de pH durante la elaboración de la salchicha de freír, desarrollados por los cultivos protectores.
- Determinar el recuento inicial y final de *E. coli* en las diferentes dosis evaluadas del cultivo protector, en comparación con el conservante químico.
- Determinar la mejor dosis de cultivos protectores según resultados obtenidos.
- Evaluar el tiempo de vida útil con análisis microbiológico y físico químico de las diferentes variables aplicadas.
- Evaluar el comportamiento de las bacterias del cultivo protector en relación al recuento de *E. coli*.

1.5.3. Hipótesis de la investigación experimental

“Los cultivos protectores *Staphylococcus carnosus* y *Lactobacillus plantarum* tienen la capacidad de funcionar como bioconservador y mantener la vida útil de la Salchicha de Freír frente a un conservante químico”

2. CAPÍTULO 1: MATERIALES Y METODOS

2.1. Ubicación de lugar de trabajo

El proceso de elaboración de la salchicha de freír, se llevó a cabo en la planta piloto de Italimentos Cia. Ltda, de la misma manera los análisis físicos químicos, microbiológicos. Los análisis genéticos de aislamiento se realizaron en el laboratorio de biología molecular de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay.

2.2. Materias Primas

Se utilizó materias primas, según los criterios de liberación de PCOLI11. Control de Calidad, de Italimentos Cia. Ltda., cumpliendo lo establecido en NTE INEN 2346:2010 Carne y Menudencias Comestibles de animales de abasto. Requisitos

Cultivo Protector, cepas de *Lactobacillus plantarum* y *Staphylococcus carnosus*.

La cepa control de *E. coli*, fue una cepa ATCC, de los laboratorios de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay.

2.3. Materiales y Métodos

Los materiales y equipos necesarios para el desarrollo de esta investigación son:

- Balanza
- Molino
- Mezclador
- Embutidora
- Refrigeradora
- Materiales de laboratorio: pHmetro, termómetro, micropipetas, stomacher, estufa, contador de colonias.
- Centrífuga
- Cabina de flujo laminar

2.4. Metodología de trabajo

La elaboración de la salchicha de freír, se llevó a cabo según procedimiento POOLICRG05. Elaboración de Salchicha de Freír.

2.5. Análisis físico químico

- La materia prima, producto en proceso y producto terminado se hizo determinaciones de pH, según IPCOLI11-04. Determinación de pH. Ver anexo I
- También se hizo control de residuos de antibióticos para garantizar la actividad normal de las bacterias en estudio. IPCOLI11-07. Determinación de antibióticos en materia prima cárnica. Ver anexo II.

2.6. Análisis microbiológico

- En materia prima, producto en proceso, producto final y seguimiento a vida útil, se determinaron *E. coli* según IPCOLI11-01. Análisis microbiológico de materia prima cárnica, producto en proceso y producto terminado. Ver anexo III
- *Staphylococcus carnosus*, según Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition (2009). Ver anexo IV.
- *Lactobacillus plantarum*, El protocolo de siembra se llevó a cabo, según lo descrito por KASIMOGLU et al (2004). Ver anexo V.

2.7. Análisis Experimental

Se realizarán 3 tratamientos con 3 repeticiones cada uno, un diseño de bloques aleatorizado, siendo la variable la dosis del cultivo protector, siendo:

T0= Salchicha de freír + conservante químico (patrón)

T1= Salchicha de freír + cultivo protector 0,05%

T2= Salchicha de freír + cultivo protector 0,03%

2.8. Análisis estadístico

Todos los resultados obtenidos en materia prima, proceso y producto final, se analizaron por:

- Promedio y desviación estándar de las repeticiones para cada tratamiento
- Análisis de la homogeneidad de la varianza de Bartlett, antes de realizar el análisis de la varianza.
- Test de multicomparación con un control, método de Tuckey para identificar los tratamientos estadísticamente diferentes, si el análisis de andeva arroja valores $p < 0.05$.

3. CAPITULO 2: RESULTADOS

3.1. Características de la materia prima cárnica

Las materias primas cárnicas en la elaboración de embutidos crudos son de gran importancia en cuanto a que condicionan los procesos de elaboración y calidad del producto final. A continuación, en la tabla 1, se muestra los valores de pH de las materias primas usadas en nuestro estudio.

Tabla 1. Valores de pH de la materia prima

T0		T1		T2	
R1	6,45	R1	6,68	R1	6,68
R2	5,97	R2	6,20	R2	6,17
R3	6,45	R3	6,45	R3	6,45
Promedio	6,29	Promedio	6,44	Promedio	6,43
<i>Desv Stan</i>	<i>0,28</i>	<i>Desv Stan</i>	<i>0,24</i>	<i>Desv Stan</i>	<i>0,26</i>

Los resultados indicados en la tabla antepuesta, indican que los valores promedio de los tres tratamientos, oscilaban entre pH 6,29 y 6.44, concordando con los requisitos establecidos en la NTE INEN 2346:2010, en dónde detallan que el rango óptimo de las carnes para consumo humano está entre pH 5,5 – 7,0.

En todas las materias primas cárnicas, el resultado de residuo de antibióticos fue negativo, teniendo certeza del accionar de los cultivos protectores en los tratamientos establecidos.

En relación a la calidad microbiológica de las materias primas, cabe destacar que los tratamientos y sus respectivas repeticiones, se usó materia prima del mismo lote de fabricación, con el objetivo de minimizar la variabilidad de dichas condiciones. En la tabla 2, a continuación, encontramos un resumen de los recuentos de *E. coli*, como el microorganismo en estudio.

Tabla 2. Valores de log ufc/g de *E. coli* de la materia prima

T0		T1		T2	
R1	3,00	R1	3,00	R1	3,00
R2	2,00	R2	2,00	R2	2,00
R3	2,80	R3	2,80	R3	2,80
Promedio	2,60	Promedio	2,60	Promedio	2,60
<i>Desv Stan</i>	<i>0,53</i>	<i>Desv Stan</i>	<i>0,53</i>	<i>Desv Stan</i>	<i>0,53</i>

Según la norma NTE INEN 2346:2010, el valor M es de 3 log ufc/g ($1,0 \times 10^3$ ufc/g), comparando con los datos promedios de los tratamientos y sus repeticiones, se establece que dichos valores cumplen lo establecido la norma nacional.

3.2. Característica del proceso de elaboración de la Salchicha de Freír

Durante las etapas de fabricación de la salchicha de freír, con los tratamientos respectivos, se evaluó y se comparó el comportamiento de las variables pH y los recuentos *E. coli*, cumpliendo en lo establecido en POOLICRG05. Elaboración de Salchicha de Freír.

3.2.1. Comportamiento del pH en la elaboración y vida útil

Las materias primas usadas, cumplieron con el criterio interno de pH inicial 5.7 y 6.5, desempeñando características normales dentro del proceso de fabricación. (ITALIMENTOS CIA. LTDA, 2015).

Tabla 3. Valores de pH registrados durante la elaboración y vida útil de la Salchicha de Freír

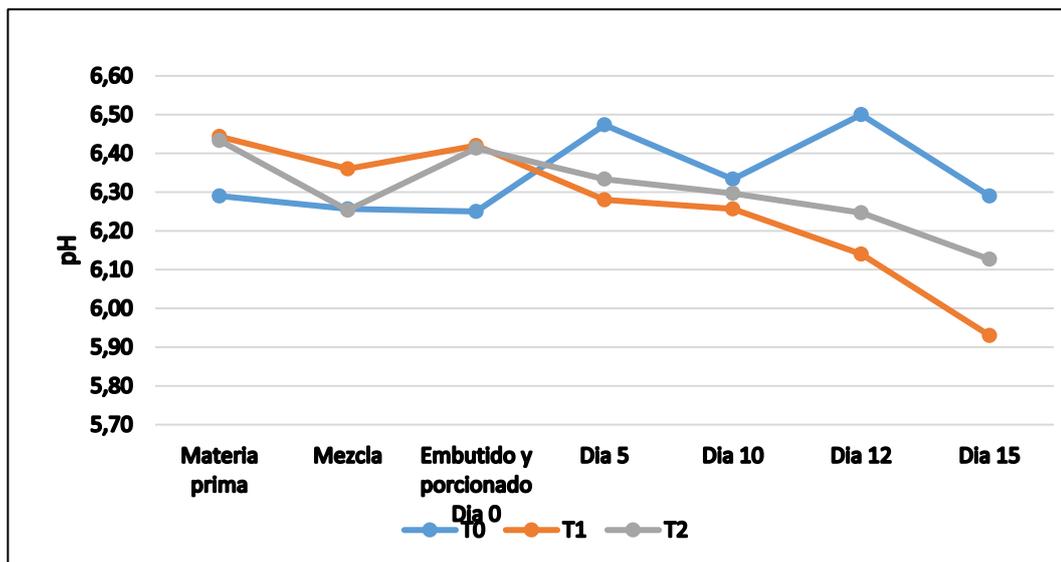
Trat	Materia prima*	Mezcla*	Embutido y porcionado Dia 0*	Dia 5*	Dia 10*	Dia 12*	Dia 15*
T0	6,29 ^a	6,26 ^a	6,25 ^a	6,47 ^a	6,33 ^a	6,50 ^a	6,29 ^a
	(0,28)	(0,06)	(0,01)	(0,05)	(0,06)	(0,02)	(0,16)
T1	6,44 ^a	6,36 ^a	6,42 ^a	6,28 ^a	6,26 ^a	6,14 ^a	5,93 ^a
	(0,24)	(0,04)	(0,03)	(0,03)	(0,14)	(0,38)	(0,10)
T2	6,43 ^a	6,25 ^a	6,41 ^a	6,33 ^a	6,30 ^a	6,25 ^a	6,13 ^a
	(0,26)	(0,05)	(0,16)	(0,13)	(0,13)	(0,47)	(0,03)

* Promedio de tres repeticiones

Letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos con un 95% de confianza

Según la tabla 3 antepuesta, podemos observar que los valores de pH entre cada tratamiento y repetición desde las materias primas hasta el día 15, no existen diferencias significativas ($p > 0.05$), con valores promedio desde pH 6,29 en materia prima hasta pH 5,93 en el último día de vida útil, resaltando que el pH no varía significativamente con o sin adición de cultivos protectores. (ver anexo VI).

Figura 1. Evolución de pH en la elaboración y tiempo de vida.



En el T0 desde la materia prima hasta el día 15, no existe ningún cambio en el valor analizado, siendo un pH de 6.29. Paralelamente en el T1, arranco con pH= 6.44 y en el día 15 se mide un pH = 5.93. Por otro lado, el T2 empieza con pH=6.43 y termina con pH= 6.13.

3.2.2. Comportamiento de *E. coli* en las etapas de elaboración y en el tiempo de vida útil en los tres tratamientos.

La norma técnica nacional NTE INEN 1338:2012 para productos cárnicos crudos en relación a *E. coli* acepta un valor M $1,0 \times 10^3$ ufc/g (log 3). Al respecto y según la tabla 4, realizando los análisis estadísticos en los recuentos iniciales de la materia prima, se determinó que no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tres tratamientos (ver anexo VII), además que cumplen lo establecido en la norma y por lo tanto se desarrolló los tratamientos con características homogéneas y buena aptitud para los procesos, por lo que, conlleva a desarrollarse cada tratamiento en similares condiciones y resultados confiables.

En el proceso de mezcla, según tabla 4 se puede observar que entre tratamientos no existe diferencia significativa ($p > 0,05$), ver anexo VIII. Este resultado nuevamente enfatiza que los recuentos iniciales de las materias primas fueron homogéneos y permiten resultados acordes. Siguiendo con el análisis, se puede observar que entre el proceso de mezclado y las condiciones de la materia prima inicial, existe un

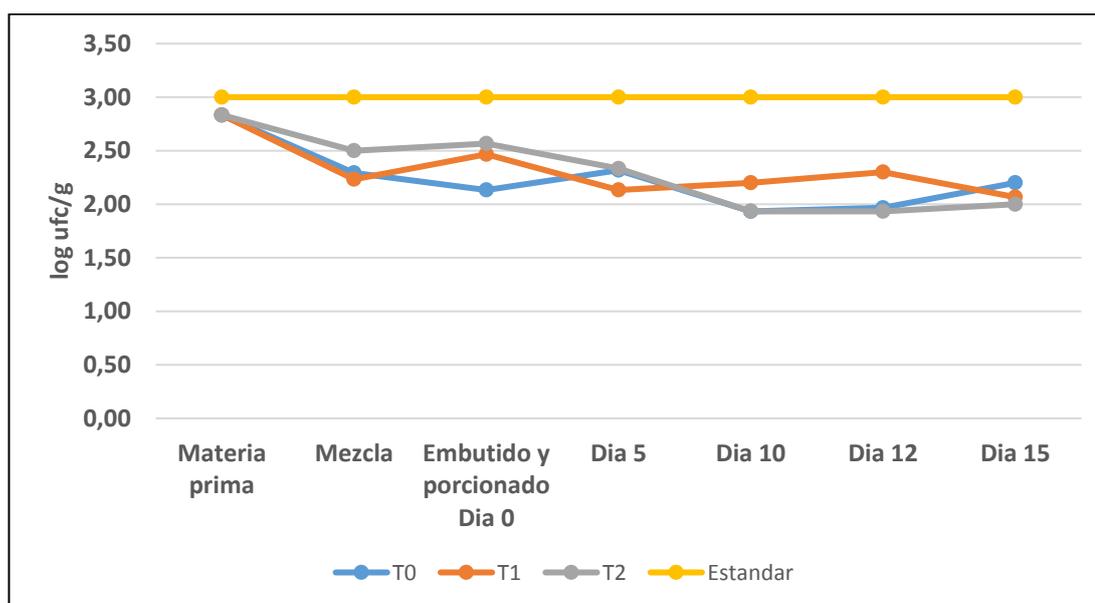
decrecimiento de los recuentos de *E.coli*, que estadísticamente no son significativos ($p>0.05$). ver anexo IX.

Tabla 4. Comportamiento del Recuento *E. coli* (log ufc/g), en la fabricación y almacenaje de la Salchicha de freír

Trat	Materia prima	Mezcla	Embutido y porcionado Dia 0	Dia 5	Dia 10	Dia 12	Dia 15
T0	2,83 ^a	2,29 ^a	2,13 ^a	2,32 ^a	1,93 ^a	1,97 ^a	2,20 ^a
	(0,85)	(0,49)	(0,23)	(0,55)	(0,06)	(0,06)	(0,17)
T1	2,83 ^a	2,23 ^a	2,47 ^a	2,13 ^a	2,20 ^a	2,30 ^a	2,07 ^a
	(0,85)	(0,64)	(0,42)	(0,58)	(0,52)	(0,61)	(0,12)
T2	2,83 ^a	2,50 ^a	2,57 ^a	2,33 ^a	1,93 ^a	1,93 ^a	2,00 ^a
	(0,85)	(0,02)	(0,51)	(0,58)	(0,06)	(0,06)	(0,03)

El tratamiento T0, tiene como variable el uso de un conservante de naturaleza química, que comparando con el T1 y T2 que llevan como variable diferentes dosis del cultivo protector, estadísticamente se comprueba que los recuentos no presentan diferencia significativa ($p>0.05$), lo que quiere decir que en esta fase la acción del conservante y del bioconservante todavía no se puede evidenciar su accionar.

Figura 2. Evolución de los recuentos de *E. coli* (log ufc/g) en la elaboración y tiempo de vida.



En relación al gráfico 2 antepuesto, observamos que los recuentos de *E. coli* en los tres tratamientos, no existe una tendencia normal de crecimiento y/o decrecimiento desde las

materias primas hasta el fin de la vida útil. También estadísticamente no existe diferencias significativas ($p>0.05$) de los recuentos entre los tratamientos y repeticiones en todas las fases de elaboración y almacenamiento. (Ver anexo X).

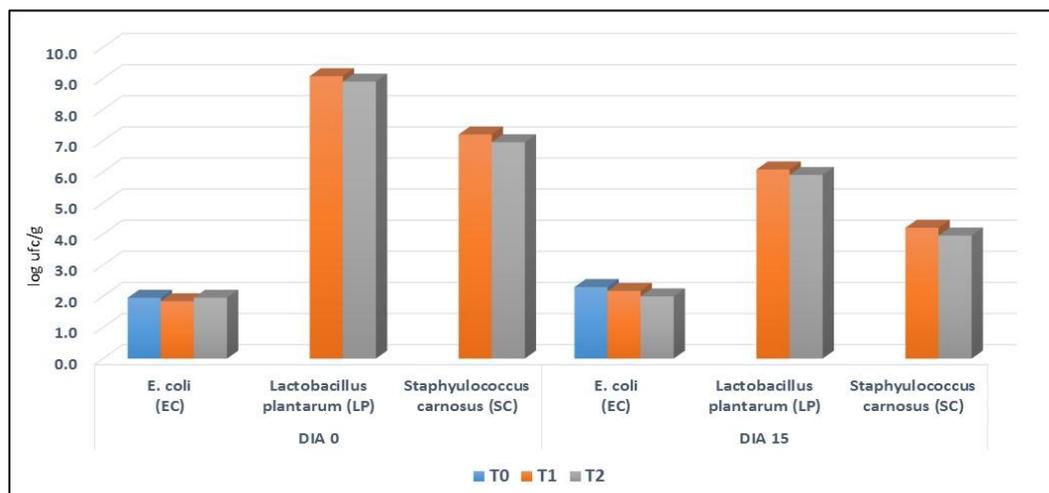
3.2.3. Comportamiento del cultivo protector vs. *E. coli* en el tiempo de vida útil.

En el día 0 (embutido y porcionado) y día 15 (fin de la vida útil), se realizaron análisis de la viabilidad de las bacterias del cultivo protector en referencia con la bacteria *E. coli*, teniendo los siguientes resultados:

Tabla 5. Comportamiento (log ufc/g) bacterias cultivo protector vs *E. coli* en la vida útil.

Trat	DIA 0			DIA 15		
	<i>E. coli</i> (EC)	<i>Lactobacillus plantarum</i> (LP)	<i>Staphylococcus carnosus</i> (SC)	<i>E. coli</i> (EC)	<i>Lactobacillus plantarum</i> (LP)	<i>Staphylococcus carnosus</i> (SC)
T0	2.0			2.3		
T1	1.8	9.1	7.2	2.2	6.1	4.2
T2	2.0	8.9	7.0	2.0	5.9	4.0

En el seguimiento del comportamiento de las bacterias del cultivos protector y *E. coli*, se puede destacar según tabla 5, el día 0 (embutido y porcionado), el comportamiento de la bacteria patógena es igual para los tres tratamientos, no existiendo diferencia significativa ($p>0.05$), valores que cumplen con la requisitos legales sanitarios. (ver anexo XI). En el mismo día para el tratamiento T1, el recuento de *L. plantarum* indican valores con alta concentración celular 1.2×10^9 ufc/g, y para el T2 recuento de 8.0×10^9 ufc/g, no existiendo diferencias significativas entre los dos tratamientos ($p>0.05$), demostrando que en ambos casos la concentración inicial bacteriana es alta (ver anexo XII). Paralelamente se realizó el recuento de *S. carnosus* arrojándonos valores para T1 = 1.6×10^7 ufc/g y T2 = 9.0×10^6 ufc/g, no existiendo diferencia significativa ($p>0.05$) entre tratamientos y de igual forma se observa recuento iniciales elevados. (ver anexo XIII).

Figura 3. Comportamiento log ufc/g bacterias cultivo protector vs *E. coli* en la vida útil

De acuerdo al gráfico 2 y tabla 5, en el día 15 (último día de vida útil), el recuento de *E. coli*, en relación al día 0 (embutado y porcionado), existe un crecimiento en 15 días a temperatura de refrigeración de 0.3 ciclos logarítmicos, que estadísticamente no tienen diferencias significativas y consecuentemente la concentración final no tuvo variaciones importantes. Por otro lado, el recuento de *L. plantarum* en el día 15 en el T1 = 1.2×10^6 ufc/g y para T2 = 8.0×10^5 ufc/g, observándose un decrecimiento de 3 ciclos logarítmico para cada tratamiento, no existiendo diferencias significativas por tratamiento entre el día 0 y el día 15. En el caso del *S. carnosus* en el T1 = 1.6×10^4 ufc/g y T2 = 9.0×10^3 ufc/g, destacando que ha existido una reducción de la concentración celular entre el día 0 y día 15 de 3 ciclos logarítmicos para cada tratamiento y además no existiendo diferencias significativas por tratamiento en la vida útil.

4. CAPITULO 3: DISCUSION

Uno de los principales parámetros que determina la actitud de la carne para ser transformada en este tipo de producto es el pH, es decir, el grado de acidez, que influye directamente en las propiedades funcionales de la carne, tales como la capacidad de retención de agua, solubilización de las proteínas, en el color y en la susceptibilidad de la carne al ataque microbiológico. (Yagüe Gil & Yagüe Domínguez, 1992). Los mismos autores comentan que para productos crudos valores de pH hasta 6.2 son adecuados, niveles superiores a estos no son recomendables, primero por la parte microbiológica y luego un consumo alto de glucógeno, resulta embutidos crudos con textura rugosa no deseable; comparando con nuestros resultados que tuvieron un rango de pH 6.29 - 6.44, se observa que dichos valores están en el límite superior, por lo que, como criterio del proceso de recepción, se estableció una desinfección con ácidos orgánicos validado para el control microbiológico y seguido de 24 horas de refrigeración como medidas correctivas después de un proceso de matanza no adecuado en el camal municipal. Al respecto, Feiner (2006), asevera que valores de pH entre 6.2 y 6.4 provoca un crecimiento microbiológico acentuado en diferentes tipos de carnes, tales como: res, pollo y cerdo. Por otro lado, el mismo autor señala que a niveles de pH altos, la acidificación natural que tuvo lugar en el tejido muscular durante el rigor mortis, puede disminuir el valor de pH hasta 5.3, siendo un obstáculo eficaz para el control microbiológico, y para valores de pH en aumento después del rigor mortis, se observan crecimiento bacteriano ya que la actividad metabólica de las proteasas como las captasinas, potencializan dicha actividad. Para Hui et al., (2012), indican que la actividad metabólica de las bacterias está diseñada para satisfacer las necesidades energéticas y nutritivas, crear un ambiente favorable para la formación de aminos biogénicas, rangos de pH óptimos para la producción de bacteriocinas, las cuales inhiben el crecimiento de microorganismos indeseables ya sea por competición nutritiva y por la formación de ácido, sabiendo que algunas cepas bacterianas son sensibles a los ácidos.

En el análisis del comportamiento en los tres tratamientos, el T0 no existió ninguna variación del valor de pH desde 6.29 hasta 6.29; en cambio de T1 varió entre 6.44 y 5.93; para T2 decreció entre 6.43 y 6.13; siendo el T1 de mayor reducción de pH como consecuencia con la dosis usada. Para Grande Burgos et al., (2011) al hablar de embutidos ligeramente fermentados, la disminución de pH en relación a las carnes frescas puede aumentar la solubilidad y actividad antimicrobiana de algunas bacteriocinas como la nisina. Para Hui et al., (2001), las salchichas fermentadas por bacterias con humedad baja ($a_w < 0,91$) y un pH bajo hasta un rango de 4,8 y 5,2 son parámetros muy efectivos para conservación del producto, concordando con Adam y Moss (2008), quienes comentan que *E. coli* es muy susceptible a la presencia de ácido en el medio, siendo un pH de 4.4 óptimo para su control.

En relación a nuestro estudio, de la tabla 3 y gráfico 1, se observa que la producción de ácidos y consecuentemente la disminución de pH en los tres tratamientos, llega a valores de disminución no determinante para la inhibición bacteriana, específicamente para ser catalogada como una barrera para el control de *E. coli*, por lo que, sea con la adición de conservante tradicional o por la adición de cultivos protectores el pH al no descender no tiene relevancia como control en la conservación.

Respecto a los antibióticos Toldra et al. (2015), señalan que la presencia de residuos de antibióticos veterinarios en la carne cruda puede perturbar la microbiota de las carnes, llevando a un fallo en la fermentación y/o accionar de bacterias favoreciendo al crecimiento de ciertos patógenos, concordando plenamente con nuestros resultados negativos, ya que el efecto de los cultivos sobre la carga microbiana se puede comparar con el efecto del aditivo químico, debido a que tuvieron resultados similares.

La calidad microbiológica para productos crudos, es sumamente crítico tanto para la carne y la grasa como materia prima; deben tener recuentos microbiológicos bajos, siendo entre 10^2 y 10^5 ufc/g para recuento de aerobias mesófilas y un rango aceptable para *E. coli* es de 10^3 ufc/g, valor que normalmente se considera a menudo como el estándar para la mayoría de empresas productoras. (Feiner, 2006). Al respecto, los valores encontrados en *E. coli* en nuestro estudio, bordean 10^3 ufc/g, dando cumplimiento a la parte legal y además siendo coherente con los requisitos de fabricación especificados. Hui et al. (2012), encontraron que recuentos de canales superiores a 10^4 ufc/g de *E. coli* O157:H7 se considera un nivel de contaminación muy elevado y se debe en su gran mayoría en fallas en el proceso de faenamiento y almacenaje. Gálvez et al. (2014) señalan que las poblaciones microbianas más frecuentemente asociadas con el entorno de la carne pertenecen principalmente a los grupos Enterobacteriaceae, ácido lácticas, *Brochothrix thermosphacta* y pseudomonas, a su vez estas bacterias en su metabolismo durante su crecimiento provocan deterioro, malos olores y consecuentemente un alimento indeseable para el consumo humano. Además, bacterias patógenas que inicialmente están en una concentración baja pueden crecer durante este deterioro como es el caso de *E. coli* y durante el almacenamiento en refrigeración, especialmente *Listeria monocytogenes*.

En el proceso de mezclado, y según la tabla Nro 4, los recuentos de esta bacteria, indican valores similares entre los tres tratamientos, además tampoco un decrecimiento de pH, pero si existe una variación con respecto a las condiciones iniciales de la materia prima. Durante este proceso, el cloruro de sodio y el nitrito de sodio, son los aditivos que agregan inicialmente, debido a su funcionalidad y control microbiológico, a diferencia del

conservante químico y cultivos protectores, que se adicionan al fin de esta etapa. Al respecto, el cloruro de sodio (NaCl), es la primera barrera de control microbiológico, además inactiva las enzimas propias de la carne, debido a la acción directa de los iones; produce un proceso de deshidratación de la carne, por la presión osmótica de las soluciones salinas; presenta una toxicidad específica para ciertos grupos de microorganismos, responsables de la deterioración, pertenecientes en su mayoría a los gram negativos. (Yagüe Gil & Yagüe Domínguez, 1992). La adición de nitrito de sodio (NaNO₂), además de fijar el color, sabor y funciones antioxidantes, el nitrito en la carne curada es un importante agente antimicrobiano, ya que es fuertemente inhibidor de las bacterias anaerobias como el *Clostridium botulinum*, pero no se considera que el nitrito sea eficaz para el control de patógenos entéricos como los Gram positivos, aunque estudios recientes han divulgado el crecimiento reducido de *E. coli* en salami. (Tarté, 2009).

Sobre la actividad de los cultivos protectores, Fiorentini et al. (2001), indican que algunas bacterias ácido lácticas presentes en la carne, producen proteínas antimicrobianas conocidas como bacteriocinas, algunas de ellas tienen un espectro antimicrobiano relativamente amplio como: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, etc. Por otro lado, Vásquez et al. (2009), comentan que dentro de los metabolitos producidos por las BAL se encuentran las bacteriocinas que son proteínas o péptidos antimicrobianos sintetizados en el ribosoma de las BAL, la célula productora sintetiza una molécula que la inmuniza contra la propia bacteriocina. Estos péptidos atacan a la membrana celular de otras bacterias evitando su reproducción.

Se debe acotar que entre los recuentos de *E. coli* desde las materias primas y día 15 (fin de vida útil), ha existido un decrecimiento en cada tratamiento, siendo: T0= 0.63; T1=0.77; y, T2=0.83, evidenciándose que el tratamiento T2 ha existido una mayor reducción de los recuentos de esta bacteria patógena, considerando que la dosis usada en este tratamiento del cultivo protector es menor a la del T1 (0,5% y 0,03%). En relación a los recuentos comparados en el último día de vida útil, se destaca que los tres tratamientos cumplen con la vida útil esperada, sin existir diferencia significativa en los recuento finales de *E. coli*, pero existiendo mejores resultados en T2, siendo esta la mejor dosis de aplicación.

Suarez et al (2008), comentan que se han determinado diferentes bacteriocinas producidas por el *Lactobacillus plantarum* poseen un efecto antagónico ante microorganismos gram positivos y, en algunos casos, en gram negativos. Los mismos autores señalan que la plantaricina F, producida por el *Lactobacillus plantarum* BF001, es efectiva sobre *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Salmonella* y *Pseudomonas*. En este estudio en el día 0 el *L. plantarum* tuvo un recuento para T1 = 1.2×10^9 ufc/g, y para el T2 recuento de 8.0×10^9

ufc/g, no existiendo diferencias significativas entre los dos tratamientos ($p>0.05$) y comparando con recuentos de *E. coli*, se observa para T1= 70 ufc/g y T2=90 ufc/g, valores aceptables. Al término de la vida útil, *L. plantarum* tuvo un recuento para T1 = 1.2×10^6 ufc/g y para T2 = 8.0×10^5 ufc/g, observándose un decrecimiento de 3 ciclos logarítmico para cada tratamiento, no existiendo diferencias significativas por tratamiento entre el día 0 y el día 15. Para *E. coli* en el día 15 existe un crecimiento en 15 días a temperatura de refrigeración de 0.3 ciclos logarítmicos, que estadísticamente no tienen diferencias significativas, evidenciándose la acción del cultivo protector, ya que no se observa crecimientos descontrolados.

Para Janssens et al., (2012), los embutidos en donde se usa el *Staphylococcus carnosus*, generalmente se observa un dominio en competencia nutritiva, debido a que es altamente tolerante a la acidez y consecuentemente predominará sobre otras bacterias menos tolerantes a la acidez. Al respecto Tarté (2009), señala que el *S. carnosus* elimina el color no deseado por la formación de peróxido de hidrógeno formado por las BAL, concordando con lo descrito por Rosenstein et al.,(2009), quienes aseveran que dentro de las ventajas del uso del *S. carnosus* en embutidos es que tienen la capacidad de reducir el peróxido de hidrógeno producido por los *Lactobacillus* catalasa negativo que se usan frecuentemente en simbiosis entre estos microorganismos, pareciéndose a los resultados obtenidos en este estudio, ya que inicialmente tuvo un recuento en T1= 1.6×10^7 ufc/g y T2 = 9.0×10^6 ufc/g, no existiendo diferencia significativa ($p>0.05$) entre tratamientos y con recuento de *E. coli* por debajo de 100 ufc/g; y para el día 15, se determinó 3 ciclos logarítmicos menos, siendo para T1= $1,6 \times 10^4$ ufc/g y T2= $9,0 \times 10^3$ ufc/g; observándose crecimientos en *E. coli* pero decrecimiento en lactobacilos, evidenciándose su acción, pudiendo ser por competencia. El *S. carnosus* ha diferencia de los otros estafilococos, tienen la capacidad de producir acetoina y son halotolerantes ya que pueden crecer en concentraciones del 15% de ClNa y además no pueden producir ácido a partir de la sacarosa y maltosa, concordando con los resultados de esta investigación, ya que se observó que el valor de pH no tuvo un decrecimiento profundo para considerar inhibición bacteriana por acidez. (Schleifer & Fischer, 1982).

5. CONCLUSIONES

En base a los objetivos planteados y a los resultados obtenidos en el presente estudio, el uso de cultivos protectores para la bioconservación de embutidos crudos, se pudo establecer lo siguiente:

- Dentro de las operaciones en la fabricación de embutidos crudos, el pH es un parámetro muy relevante para el control del proceso; en este estudio observamos que el valor de pH nunca tuvo una variación significativa para ser considerada un factor de control o de inhibición en frente del *E. coli*, por lo que, la incidencia de los cultivos protectores en la formación de ácido como barrera es nula.
- El uso de cultivos protectores como el *Lactobacillus plantarum* y *Staphylococcus carnosus* en la elaboración de embutidos crudos para el control de un microorganismo patógeno como el *E. coli*, demostró tener un efecto como bioconservante, debido a que su comportamiento fue de una manera similar al conservante químico usado comúnmente en las industrias, ya que el tiempo de vida útil del producto contrastando las dos variantes, tuvieron los mismos resultados de 15 días.
- Se realizaron dos ensayos con diferentes dosis del cultivo protector, evidenciándose comportamientos similares de bioconservación sobre el *E. coli*, además se observó que los recuento iniciales de esta bacteria en relación a los recuento finales, no hubo un crecimiento esperado; destacando que existió un efecto contrario, ya que se registró un decrecimiento no muy pronunciado pero eficaz para el control de dicha bacteria, siendo el T2 la mejor dosis.
- Por la concentración celular inicial y final del *L. plantarum* y *S. carnosus*, se establece que su accionar como bioconservante, está dada por una simbiosis bacteriana, proponiendo que el *L. plantarum* es el responsable de la producción de una bacteriocina o formación de peróxido de hidrógeno y paralelamente el *S. carnosus* provocará una competencia nutritiva con las otras bacterias del medio, induciendo a la inhibición, ya que no se puede evidenciar otro mecanismo de acción.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adams, M., Moss, M. 2008. Food Microbiology. Third Edition. RSC Publishing. 477 pp.
- Alais, C. 1971. Ciencia de la leche. Principios de tecnología lechera. Editorial Reverté, S.A. España. 373 p
- AOAC 991. 14-1994(2002), Coliform and *Escherichia coli* counts in.
- Avisé, J. 1996. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman & Hall. 5(2).441-442.
- CSIC, 2004. Electroforesis de proteínas. Curso de Doctorado en Biotecnología Centro Andaluz de Biología del Desarrollo Universidad Pablo de Olavide. Sevilla
- De Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N., Ludwig, W., Rainey, F., Schleifer, KH., Whitman, W. 2009. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition. Volume Three. Springer. 1450 pp.
- Dunn, M. 1986. Gel of Electrophoresis of Protein. Wright. 415 pp.
- FAO. 2011. Preventig *E. coli* in food. 16 pp
- Feiner, G. 2006. Meat Products Hankbook. Practical Science and Technology. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC. 671 pp.
- Fiorentini, A.M., Sant'Anna, E.S., Porto, A., Mazo, J., Franco, B. 2001. Influence of Bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* BM in the shelf life of refrigerated bovine meat. Brazilian Journal Microbiology. 32:42-46
- Gálvez, A., Grande, M., Lucas, R., Pérez, R. 2014. Food Biopreservation. Springer. 121 pp.
- Geisen, R., Lucke, F K., Krockel, I. 1991. Fleischwiptsch. 71, 969 – 981.
- Grande Burgos, J., Lucas, R.,López Aguayo, M., Pérez Pulido, R., Gálvez, A. 2011. Bioconservación de Alimentos Cárnicos. Anales-Vol. 24(1), 111-123.
- Hames, B.D. 1998. Gel Electrophoresis of Proteins. A practical Approach. Third Edition.Oxford University Press. 373 pp.
- Hui, Y.H. 2012. Handbook of Meat and Meat Processing. CRC Press. 979 pp.

- Hui, Y.H., Nip, W., Rogers, R., Young, O. 2001. Meat Science and Applications. Marcel Dekker. 674 pp.
- Invitrogen. 2007. Pure Link Genomic DNA Mini Kit. 4 pp.
- Janssens, M., Myter, N., De Vuyst, L., Leroy, F. 2012. Species diversity and metabolic impact of the microbiota in low spontaneously acidified Belgian sausages with an added starter culture of *Staphylococcus carnosus*. Food Microbiology. 29(2012), 167-177.
- Jay, J., Loessner, M., Golden, D. 2005. Modern Food Microbiology. Seventh Edition. Springer. 782 pp.
- Kasimoglu, A., Göncüoğlu, M. y Akgün, S. 2004. Probiotic white cheese with *Lactobacillus acidophilus*. International Journal of Dairy Technology 58(1):30-38.
- Lindgren, S.E. y Dobrogosz, W.J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microbiology Reviews 87: 149-164.
- Minor, H., Ponce, E., Macías, S. y Guerrero, I. 2002. Conservación de la carne fresca de cerdo por fermentación láctica: Efecto sobre el color, la textura y la formación de ácidos grasos libres. Revista Mexicana de Ingeniería Química 1:73-80.
- Montville, T., Han-Ming Hsu, A., Meyer, M. 1987. High-Efficiency Conversion of Pyruvate to Acetoin by *Lactobacillus plantarum* during pH-Controlled and Fed-Batch Fermentations. Applied and Environmental Microbiology 53(8), 1798-1802.
- Rahman, M.S. 2007. Handbook of Food Preservation. Second Edition. CRC Press. 1088 pp.
- Rosenstein, R., Nerz, C., Biswas, L., Resch, A., Raddatz, G., Schuster, S., Götz. 2009. Genome Analysis of the Meat Starter Culture Bacterium *Staphylococcus carnosus* TM300. Applied and Environmental Microbiology. 75 (3), 811-822.
- Scheleifer, K.H., Fisher, U. 1982. Description of a New Species of the Genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*. International Journal of Systematic Bacteriology. 32(2), 153-156.

- Schlötterer, C. 2004. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion
Nature Reviews 5: 63-69
- Súarez, H., Francisco, A., Beriao, L. 2008. Influencia de Bacteriocinas producidas por
Lactobacillus plantarum LPBM10 sobre la vida útil de filetes del híbrido de
Cachama *Piaractus brachypomus* x *Colossoma macropomum* Empacado al
vacío. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. 15(1), 32-40.
- Tarté, R. 2009. Ingredients in Meat Products. Properties, Functionality and
Applications. Springer. 421 pp
- Toldrá, F., Hui, Y.H., Astiasarán, I., Sebranek, J., Talon, R. 2015. Handbook of
Fermented Meat and Poultry. Second Edition. Wiley Blackwell. 534 pp.
- Varnam, A.H. y Sutherland, J.P. 1998. Meat and Meat Products. Technology, C
Chemistry and Microbiology. Chapman & Hall. 430 pp.
- Vásquez, S., Suárez, H., Zapata, S. 2009. Use of antimicrobial substances produced
by acid lactic bacteria on meat conservation. *Rev Chil Nutr* 36(1), 64 – 71.
- Vásquez, S.M., Suárez, H., Montoya, O. 2009. Evaluación de Bacteriocinas como
medio protector para la Biopreservación de la carne bajo refrigeración. 2009.
Revista Chilena de Nutrición. Vol. 36(3), 228-238
- Yagüe Gil, A., Yagüe Domínguez, F. 1992. Preparación, Fabricación y Defectos de
los Embutidos Curados. Ediciones Ayala, S.L. 194 pág.

7. ANEXOS**ANEXO I**

	IPCOLI11-04
DETERMINACION DE pH	EDICION:
	PAGINA: 23 DE 6

INDICE

1. OBJETIVO
2. ALCANCE
3. REFERENCIAS
4. DEFINICIONES
5. RESPONSABILIDADES
6. METODOLOGIA
7. REGISTROS
8. MODIFICACIONES
9. ANEXOS

1. OBJETIVO

Determinar el valor de pH presente en los productos elaborados por la Italiana.

2. ALCANCE

Aplica a todos los productos elaborados por la Italiana.

3. REFERENCIAS

- Galignani Máximo y col, Determinación de nitritos en chorizos por espectrofotometría, Departamento de Química, Universidad de los Andes (ULA), apartado postal 440.

4. DEFINICIONES

4.1. PH

El pH juega un papel muy importante en la preservación de un alimento. El pH tiene una gran influencia en la actividad de los conservadores como los nitritos, ya que éstos pueden disociarse en solución acuosa y deber su acción, bien a los hidrogeniones liberados en la solución, o bien a la parte no disociada. Se ha demostrado que el efecto antibacteriano del nitrito aumenta cuando el pH disminuye dentro de los límites ácidos.

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Del Laboratorista (LB)

- 5.1.1. Preparar los materiales para los ensayos.
- 5.1.2. Realizar el muestreo de producto terminado.
- 5.1.3. Desarrollar los ensayos correspondientes, según metodología de referencia.
- 5.1.4. Registrar los resultados y comunicar al JAC.

6. METODOLOGÍA

6.1. MATERIALES

- 6.1.1. Potenciómetro
- 6.1.2. Buffers de calibración
- 6.1.3. Agua Destilada
- 6.1.4. Cuchillo
- 6.1.5. Termómetro

6.2. PROCEDIMIENTO

6.2.1 DETERMINACION DE pH

- 6.2.1.1** Presionar la tecla "HOLD" por unos segundos para encender.
- 6.2.1.2** Medir la temperatura de los buffers de calibración y calibrar el potenciómetro antes de realizar los análisis (referirse al manual del fabricante).
- 6.2.1.3** Medir la temperatura de cada producto a analizar e introducirla en el potenciómetro cada vez que se realice la medición.
- 6.2.1.4** Realizar un corte en el producto.
- 6.2.1.5** Introducir el electrodo.
- 6.2.1.6** Esperar a que se estabilice el valor.
- 6.2.1.7** Anotar el valor leído y registrar en RPCOLI 11-07

7. RECOMENDACIONES Y PRECAUCIONES

- 7.1. Calibrar siempre el potenciómetro antes de iniciar el análisis.
- 7.2. Limpiar el electrodo con agua destilada para cada medición.
- 7.3. Guardar apropiadamente el potenciómetro sumergiendo el electrodo en unas gotas de cloruro de potasio KCl.
- 7.4. Guardar en lugar seco y frío (Temperatura de almacenaje inferior a 30°C).

8. REGISTROS

No tiene.

9. MODIFICACIONES

Es edición 2

10. ANEXOS

No tiene.

ANEXO II

	IPCOL11-07
DETERMINACION DE ANTIBIÓTICOS EN MATERIA PRIMA CÁRNICA	EDICION: 1
	PAGINA: 26 DE 6

INDICE

1.OBJETIVO

2. ALCANCE

3. REFERENCIAS

4. DEFINICIONES

5. RESPONSABILIDADES

6. METODOLOGIA

7. REGISTROS

8. MODIFICACIONES

6. ANEXOS

1. OBJETIVO

Determinar presencia o ausencia de antibióticos en materia prima cárnica que se recibe en "ITALIMENTOS".

2. ALCANCE

Aplica a la materia prima cárnica que se recibe en "ITALIMENTOS".

3. REFERENCIAS

- Plus, M. (Noviembre de 2015). *MedlinePlus*. Obtenido de <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/antibiotics.html>
- Amerling, C. (2003). *Tecnología de la carne*. Recuperado el Noviembre de 2015, de https://books.google.com.ec/books?id=9NweMkWe9VEC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Hansen, C. (Septiembre de 2015). *Chr. Hansen Improving food & health* . Obtenido de <http://www.chr-hansen.es/productos/kits-de-deteccion-de-antibioticos/tests-microbianos-de-deteccion-de-antibioticos.html>
- Moreno, L. V. (2002). *Revista Científica, Residuos tóxicos en tejidos animales*. Recuperado el 04 de Enero de 2015, de <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/27629/2/articulo6.pdf>

4. DEFINICIONES

- **Antibiótico:** Es una sustancia química producida por un ser vivo o derivado sintético, que mata o impide el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles, generalmente se aplica a aquellos fármacos usados en el tratamiento de infecciones por bacterias, de ahí que se les conozca como antibacterianos. Los antibióticos se utilizan en medicina humana, animal y horticultura para tratar infecciones provocadas por gérmenes. Normalmente los antibióticos presentan toxicidad selectiva, siendo muy superior para los organismos invasores que para los animales o los seres humanos que los hospedan, aunque ocasionalmente puede producirse una reacción adversa medicamentosa, como afectar a la flora bacteriana normal del organismo. Los antibióticos generalmente ayudan a las defensas de un individuo hasta que las respuestas locales sean suficientes para controlar la infección. Un antibiótico es bacteriostático si impide el crecimiento de los gérmenes, y bactericida si los destruye, pudiendo generar también ambos efectos, según los casos. (Plus, 2015)
- **Materia prima cárnica:** La industria cárnica es la industria de alimentación que mayor volumen de ventas mueve. Este tipo de industria alimentaria trabaja con las materias primas de la carne procedente del sacrificio de ganado para el consumo humano del porcino, el ganado vacuno, principalmente. En algunas ocasiones también el ganado equino y los camellos. El matadero es el elemento inicial del proceso de elaboración y sus procesos específicos son el sacrificio y el deshuesado, los trabajadores de esta industria, independientemente del tipo de carne, suelen estar muy especializados en el despiece de las carnes. Parte de

la carne se dedica directamente al consumo humano, y parte se lleva a otras industrias de procesado de embutidos diversos, ahumado, enlatado, comida de animales. La industria cárnica suele tener como productos finales en el proceso de producción la carne congelada, la carne picada, la carne fresca ofrecida en diversos cortes, y embutidos diversos. (Amerling, 2003)

- **Prime^RTest:** Los test microbianos para detección de antibióticos son tests capaces de detectar un amplio espectro de antibióticos, incluidos beta-lactámicos, tetraciclinas, sulfonamidas y amino glucósidos. Los test utilizan esporas bacterianas suspendidas en medio agar y los resultados son detectados por cambios de color, por un indicador de pH o redox. (Hansen, 2015)

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Del Laboratorista (LB)

- 5.1.1. Preparar los materiales para los ensayos.
- 5.1.2. Realizar el muestreo de producto terminado.
- 5.1.3. Desarrollar los ensayos correspondientes, según metodología de referencia.
- 5.1.4. Registrar los resultados y comunicar al JAC.

6. METODOLOGÍA

6.1 Materiales

- 6.1.1 Cuchillo estéril
- 6.1.2 Alcohol al 70%
- 6.1.3 Guantes de látex
- 6.1.4 Incubador Premi^RTest
- 6.1.5 Ampollas con agar pH indicador
- 6.1.6 Cronómetro
- 6.1.7 Tijera
- 6.1.8 Marcador
- 6.1.9 Prensador para muestras
- 6.1.10 Fundas para muestreo wirlpack
- 6.1.11 Agua destilada

6.2 PROCEDIMIENTO

- 6.2.1 Con el cuchillo estéril tomar no menos de 100g de muestra, las partes a muestrear serán: Hígado, riñones y músculo, evitando tejido conectivo y adiposo (res, cerdo o pollo).
- 6.2.2 Cortar el número requerido de ampollas con las tijeras, evitar derramar las ampollas restantes.

- 6.2.3** Pipetear 100ul del líquido dentro de la ampolla con agar. No dañar el agar.
- 6.2.4** Dejar reposar 20 min en la estación de temperatura para una pre-difusión.
- 6.2.5** Enjuague el líquido extraído de la carne 2 veces con agua destilada y remueva el agua de la prueba cuidadosamente.
- 6.2.6** Cierre las ampollas del test con papel aluminio.
- 6.2.7** Verifique la temperatura de la incubadora (64°C) y coloque la ampolla en el bloque caliente.
- 6.2.8** Retirar las ampollas del bloque caliente, luego el color negativo cambiará de color (aprox. 3h).
- 6.2.9** Anexo 1

8. REGISTROS

No tiene.

9. MODIFICACIONES

Ninguna

10. ANEXOS

10.1. Premi[®]Test ampoule photo instructions (Anexo 1)

Premi[®]Test

Premi[®]Test ampoule photo instructions



1. Cut of the required number of ampoules with a pair of scissors; be careful not to damage the foil of remaining ampoules.



2. Take approximately 2 cm³ of lean meat and use a meat press to extract about 250 µl of meat fluid.



3. Pipette 100 µl of fluid onto the agar in the ampoule. Do not distort the agar.



4. Allow to stand at room temperature for 20 minutes for a pre-diffusion.



5. Flush the meat fluid away by washing the test twice with demi water and remove the water from the test carefully.



6. Close the test ampoules with foil.



7. Check the temperature of the DSM block heater (64.0°C or 147°F). Put the ampoule in the block heater.



8. Withdraw the ampoules from the block heater after the negative control changed color. (Approx. 3 hours)

Meat sample - ---Negative	•	Bacteria growth - -	•		•	- - - - -
Meat sample - ---Positive	•	No bacterial growth - -	•		•	- - - - -

For more information please contact:
 DSM Venturing & Business Development
 DSM PremiTest RV

Or our local representative:

ANEXO III

	IPCOLI11-01
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE MATERIA PRIMA CÁRNICA Y PRODUCTO TERMINADO	EDICION: 2
	PAGINA: 31 DE 5

INDICE

1 OBJETIVO

2. ALCANCE

3. REFERENCIAS

4. RESPONSABILIDADES

5. METODOLOGIA

6. REGISTROS

7. MODIFICACIONES

8. ANEXOS

1. OBJETIVO

Determinar el recuento bacteriano presente en la materia prima cárnica y producto terminado.

2. ALCANCE

Aplica para el control periódico del recuento bacteriano que se efectúa a la materia prima cárnica y el producto terminado.

3. REFERENCIAS

- 3.1. AOAC 986.33. Bacterial and Coliform Counts in Milk, Dry Rehydratable Film Method (3M Microbiology / 3M, 225-5S 3M Center, St. Paul, MN 55144 USA).
- 3.2. AOAC 989.10. Bacterial and Coliform Counts in Dairy Products, Dry Rehydratable Film Method (Petrifilm for Coliforms) (3M Microbiology / 3M, 225-5S 3M Center, St. Paul, MN 55144 USA).
- 3.3. AOAC 990.12. Aerobic Plate Count in Foods, Dry Rehydratable Film (Petrifilm Aerobic Plate Count) Method, (3M Microbiology / 3M, 225-5S 3M Center, St. Paul, MN 55144 USA).
- 3.4. AOAC 991.14. Coliforms and Escherichia coli Counts in Foods, Dry Rehydratable Film (Petrifilm Count Plate) Methods (3M Microbiology / 3M, 225-5S 3M Center, St. Paul, MN 55144 USA).
- 3.5. AOAC 996.02. Coliform Count in Dairy Products, High Sensitivity Dry Rehydratable Film Method (Petrifilm High Sensitivity Coliform Count Plate) Methods (3M Microbiology / 3M, 225-5S 3M Center, St. Paul, MN 55144 USA).
- 3.6. AOAC 997.02. Yeast and Mold Counts in Foods, Dry Rehydratable Film Method (Petrifilm for Yeast and Molds) (3M Microbiology / 3M, 225-5S 3M Center, St. Paul, MN 55144 USA).
- 3.7. AOAC 998.08. Escherichia coli Counts in Poultry, Meats, and Seafood, Dry Rehydratable Film Method (Petrifilm EC Plate Method) (3M Microbiology / 3M, 225-5S 3M Center, St. Paul, MN 55144 USA).
- 3.8. AOAC 2000.15. Dry Rehydratable Film for the Rapid Enumeration of Coliform Counts in Foods (Petrifilm for Rapid Enumeration of Coliforms) (3M Microbiology, 225-5S 3M Center, St. Paul, MN 55144 USA).
- 3.9. AOAC 2001.05. Petrifilm Rapid S. aureus Count Plate Method for the Rapid Enumeration of Staphylococcus aureus in Selected Foods (3M Microbiology, 225-5S 3M Center, St. Paul, MN 55144 USA).
- 3.10. AOAC 2003.07. 3 M Petrifilm Staph Express Count Plate Method for the Enumeration of *Staphylococcus aureus* in Selected Types of Processed and Prepared Foods (3M Microbiology, 3M Center, Building 260-6B-01, St. Paul, MN 55144-1000, USA).
- 3.11. AOAC 2003.08. 3 M Petrifilm Staph Express Count Plate Method for the Enumeration of *Staphylococcus aureus* in Selected Dairy Foods (3M Microbiology, 3M Center, Building 260-6B-01, St. Paul, MN 55144-1000, USA).

- 3.12. AOAC 2003.11. 3 M Petrifilm Staph Express Count Plate Method for the Enumeration of *Staphylococcus aureus* in Selected Types of Meat, Seafood, and Poultry (3M Microbiology, 3M Center, Building 260-6B-01, St. Paul, MN 55144-1000, USA).

4. RESPONSABILIDADES

4.1. DEL LABORATORISTA (LAB)

- 4.1.1. Preparar los materiales para los ensayos.
- 4.1.2. Realizar el muestreo de la materia prima cárnica y el producto terminado.
- 4.1.3. Desarrollar los ensayos correspondientes, según metodología de referencia.
- 4.1.4. Registrar los resultados y comunicar al JAC.

5. METODOLOGIA

5.1. FUNDAMENTO

El método Petrifilm es un método rápido para el análisis microbiológico, y ofrece una solución lista para usar, consiguiendo con ello, reducir el tiempo de trabajo además de minimizar costos.

Las placas contienen un agente gelificante, nutrientes deshidratados, indicadores específicos para identificar características propias de cada microorganismo, un sistema de doble película para atrapar el gas que producen algunos microorganismos y facilitar su identificación. Además posee una cuadrícula en la película inferior que facilita el recuento minimizando la probabilidad de error.

5.1.1. Recuentos Microbiológicos

Los recuentos bacteriológicos dan la pauta de la cantidad de bacterias que están presentes en el producto en un momento determinado antes o después de un proceso, este valor debe estar dentro de especificaciones y mejor si están cercanos del límite inferior.

5.1.2. Bacterias Patógenas

Estas bacterias son causantes de las enfermedades transmitidas por alimentos, ETA's, entre ellas tenemos a la Salmonella, *E. coli*, *S. aureus*, debe haber ausencia para que el alimento pueda ser consumido sin problema.

5.1.3. Recuento de Aerobios

Esta determinación es importante ya que nos da una idea del tiempo de vida útil de un producto porque superado el recuento máximo establecido el producto empieza a degradarlo.

5.2. MATERIALES Y REACTIVOS

- 5.2.1. Placas Petrifilm 3M: aerobios, coliformes totales/E. coli, S. aureus, mohos y levaduras.
- 5.2.2. Alcohol 70° GL
- 5.2.3. Algodón
- 5.2.4. Pipetas automáticas
- 5.2.5. Puntas estériles
- 5.2.6. Frascos tapa rosca con 90 ml de agua de peptona al 0.1% estéril
- 5.2.7. Tubos de ensayo con 9 ml de agua de peptona al 0,1 % estéril
- 5.2.8. Fundas Whirl pak estériles
- 5.2.9. Gradilla de tubos
- 5.2.10. Difusores de placas petrifilm
- 5.2.11. Mecheros de bunsen o lámparas de alcohol
- 5.2.12. Estufas
- 5.2.13. Autoclave
- 5.2.14. Contador de colonias
- 5.2.15. Balanza

5.3. DESARROLLO

- 5.3.1. Esterilizar el material necesario (pipetas, tubos, frascos) en autoclave a 121 ° C por 15 minutos y hasta 15 psi de presión.
- 5.3.2. Dejar enfriar el material esterilizado.
- 5.3.3. Desinfectar la superficie de trabajo con alcohol 70°GL
- 5.3.4. En un ambiente estéril, con los mecheros de bunsen encendidos pesar 10g (± 0.2) de muestra en una funda Whirl pak estéril.
- 5.3.5. Colocar 90 ml de agua de peptona al 0.1%, extraer todo el aire posible y proceder a triturar la muestra de manera que se formen partículas no mayores de 5mm. De esta forma obtenemos la dilución 1/10 (10^{-1}).
- 5.3.6. Tomar 1 ml de la dilución anterior 1/10 y diluir en un tubo con 9 ml de agua de Peptona 0.1% (Dilución 1/100) se realizarán mas diluciones según fuese necesario.
- 5.3.7. Colocar 1 ml de la dilución en la placa de petrifilm correspondiente al microorganismo a analizar.
- 5.3.8. Con la ayuda del difusor se distribuye correctamente el líquido en la placa.
- 5.3.9. Esperar por lo menos un minuto a que solidifique el gel.
- 5.3.10. Incubar las placas cara arriba en grupos de no más de 20 piezas, según:

- Coliformes, Aerobios, S. aureus, E. coli a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h
- Mohos y Levaduras a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 3 – 5 – 7 días

5.3.11. Luego del periodo de incubación, sacar las placas y contar en un contador de colonias estándar u otro tipo de lupa con luz.

5.4. INTERPRETACIÓN Y REGISTRO DE RESULTADOS

Para la interpretación de resultados el LAB toma como referencia las cartillas de 3M y registra los resultados en el formato respectivo (ver RPCOLI11-08 del PCOLI11. Control de Calidad).

5.5. MEDIDAS PREVENTIVAS

El LAB se asegura de la limpieza de los materiales antes y después de su uso, incluyendo la esterilización de los medios utilizados antes del desecho final.

6. REGISTROS

RPCOLI11-08 Registro de Resultados Microbiológicos (ver Anexo A).

7. MODIFICACIONES

Es Edición 2.

8. ANEXOS

Anexo A

RPCOLI11-08 Registro de Resultados Microbiológicos.

ANEXO IV

DETERMINACION DE *Staphylococcus spp*

1. REFERENCIAS

- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition (2009)

2. MATERIALES Y REACTIVOS

- 2.1. Cajas Petri de plástico estériles
- 2.2. Alcohol 70° GL
- 2.3. Algodón
- 2.4. Pipetas automáticas
- 2.5. Puntas estériles.
- 2.6. Frascos tapa rosca con 90 ml de agua de peptona al 0.1% estéril
- 2.7. Tubos de ensayo con 9 ml de agua de peptona al 0,1 % estéril
- 2.8. Fundas Whirl pak estérile
- 2.9. Gradilla de tubos.
- 2.10. Cabina de flujo laminar
- 2.11. Estufas
- 2.12. Autoclave
- 2.13. Contador de colonias
- 2.14. Balanza
- 2.15. Agua peptona
- 2.16. Agar Manitol salado

3. DESARROLLO

- 3.1. Esterilizar el material necesario (pipetas, tubos, frascos) en autoclave 121°C por 12 minutos y hasta 12 psi de presión.

- 3.2. Dejar enfriar el material esterilizado
- 3.3. Desinfectar las superficies de trabajo (cabina flujo laminar) con alcohol 70°
- 3.4. Dejar enfriar el material esterilizado.
- 3.5. Desinfectar superficies de trabajo (cabina flujo laminar) con alcohol a 70°.
- 3.6. En un ambiente estéril pesar 10 g (± 0.2) de muestra en una funda whirl pak estéril.
- 3.7. Colocar 90 ml de agua de peptona al 0.1% extraer todo el aire posible y proceder a triturar la muestra de manera que se formen partículas no mayores de 2 mm. De esta forma obtenemos una dilución 10^{-1}
- 3.8. Tomar 1 ml de la dilución en la caja Petri.
- 3.9. Esperar por lo menos un minuto que se solidifique el gel.
- 3.10. Incubar la placas cara arriba a 37 ° por 24 horas
- 3.11. Luego del periodo de incubación, sacar las placas y contar en un contador.

4. INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Colonias de color amarillo rodeadas de o no de un halo amarillo.

ANEXO V

DETERMINACION DE *Lactobacillus spp*

1. REFERENCIAS

- Probiotic whitecheese with *Lactobacillus acidophilus*. *Internacional Dairy Journal* 14: 1067-1073.

2. MATERIALES Y REACTIVOS

2.2. Cajas Petri de plástico estériles

2.2. Alcohol 70° GL

2.3. Algodón

2.4. Pipetas automáticas

2.5. Puntas estériles.

2.6. Frascos tapa rosca con 90 ml de agua de peptona al 0.1% estéril

2.7. Tubos de ensayo con 9 ml de agua de peptona al 0,1 % estéril

2.8. Fundas Whirl pak estériles

2.9. Gradilla de tubos.

2.10. Cabina de flujo laminar

2.11. Estufas

2.12. Autoclave

2.17. Contador de colonias

2.18. Balanza

2.19. Agua peptona

2.20. Agar MRS.

2.21. Frasco para anaerobiosis.

2.22. Sachet para anaerobiosis.

4. DESARROLLO

3.1. Esterilizar el material necesario (pipetas, tubos, frascos) en autoclave 121°C por 12 minutos y hasta 12 psi de presión.

3.2. Dejar enfriar el material esterilizado

- 3.3. Desinfectar las superficies de trabajo (cabina flujo laminar) con alcohol 70°
- 3.4. Dejar enfriar el material esterilizado.
- 3.5. Desinfectar superficies de trabajo (cabina flujo laminar) con alcohol a 70°.
- 3.6. En un ambiente estéril pesar 10 g (± 0.2) de muestra en una funda whirl pak estéril.
- 3.7. Colocar 90 ml de agua de peptona al 0.1% extraer todo el aire posible y proceder a triturar la muestra de manera que se formen partículas no mayores de 2 mm. De esta forma obtenemos una dilución 10^{-1}
- 3.8. Ajustar el pH = 4.5.
- 3.9. Tomar 1 ml de la dilución en la caja Petri.
- 3.10. Esperar por lo menos un minuto que se solidifique el gel.
- 3.11. Incubar las placas cara arriba a 37 ° por 72 horas en anaerobiosis.
- 3.12. Luego del periodo de incubación, sacar las placas y contar en un contador.

4. INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Colonias de color blanco como positivo.

ANEXO VI

Análisis estadístico del pH las materias primas

 SUMMARY STATISTICS FOR pH

BARTLETT TEST FOR HOMOGENEITY OF GROUP VARIANCES = 1.046

APPROXIMATE F = 0.284 DF = 3,115 PROBABILITY = 0.837

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE SUM OF SQUARES DF MEAN SQUARE F PROBABILITY

BETWEEN GROUPS 0.007 3 0.002 0.444 0.728

WITHIN GROUPS 0.040 8 0.005

TUKEY HSD MULTIPLE COMPARISONS

MATRIX OF PAIRWISE COMPARISON PROBABILITIES

1 2 3

1 1.000

2 0.669 1.000

3 0.936 0.936 1.000

ANEXO VII

Análisis estadístico microbiológico de las materias primas

SUMMARY STATISTICS FOR MP

ONE OR MORE OF YOUR GROUPS HAS NO VARIANCE.

ANEXO VIII

Análisis estadístico del proceso de mezclado

SUMMARY STATISTICS FOR M

ONE OR MORE OF YOUR GROUPS HAS NO VARIANCE.

ANEXO IX**Análisis estadístico del comportamiento de *E. coli* en proceso Mezclado**

SUMMARY STATISTICS FOR Mezclado (M)

BARTLETT TEST FOR HOMOGENEITY OF GROUP VARIANCES = 1.133

APPROXIMATE F = 0.460 DF = 2, 81 PROBABILITY = 0.633

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE	SUM OF SQUARES	DF	MEAN SQUARE	F	PROBABILITY
BETWEEN GROUPS	0.015	2	0.008	0.031	0.969
WITHIN GROUPS	1.454	6	0.242		

MATRIX OF PAIRWISE ABSOLUTE MEAN DIFFERENCES

	1	2	3
1	0.000		
2	0.060	0.000	
3	0.040	0.100	0.000

TUKEY HSD MULTIPLE COMPARISONS

MATRIX OF PAIRWISE COMPARISON PROBABILITIES

	1	2	3
1	1.000		
2	0.988	1.000	
3	0.995	0.967	1.000

ANEXO X**Estadística de los recuentos *E. coli* en la fases de elaboración y almacenamiento.**

SUMMARY STATISTICS FOR MT

BARTLETT TEST FOR HOMOGENEITY OF GROUP VARIANCES = 0.084

APPROXIMATE = 0.034 DF = 2, 81 PROBABILITY = 0.967

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE	SUM OF SQUARES	DF	MEAN SQUARE	F	PROBABILITY
BETWEEN GROUPS	0.020	2	0.010	0.015	0.985
WITHIN GROUPS	3.900	6	0.650		

MATRIX OF PAIRWISE ABSOLUTE MEAN DIFFERENCES

	1	2	3
1	0.000		
2	0.000	0.000	
3	0.100	0.100	0.000

TUKEY HSD MULTIPLE COMPARISONS

MATRIX OF PAIRWISE COMPARISON PROBABILITIES

	1	2	3
1	1.000		
2	1.000	1.000	
3	0.987	0.987	1.000

 SUMMARY STATISTICS FOR M

BARTLETT TEST FOR HOMOGENEITY OF GROUP VARIANCES = 1.133

APPROXIMATE F = 0.460 DF = 2, 81 PROBABILITY = 0.633

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE	SUM OF SQUARES	DF	MEAN SQUARE	F	PROBABILITY
BETWEEN GROUPS	0.015	2	0.008	0.031	0.969
WITHIN GROUPS	1.454	6	0.242		

MATRIX OF PAIRWISE ABSOLUTE MEAN DIFFERENCES

	1	2	3
1	0.000		
2	0.060	0.000	
3	0.040	0.100	0.000

TUKEY HSD MULTIPLE COMPARISONS

MATRIX OF PAIRWISE COMPARISON PROBABILITIES

	1	2	3
1	1.000		
2	0.988	1.000	
3	0.995	0.967	1.000

SUMMARY STATISTICS FOR EYP

BARTLETT TEST FOR HOMOGENEITY OF GROUP VARIANCES = 1.164

APPROXIMATE F = 0.473 DF = 2, 81 PROBABILITY = 0.625

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE	SUM OF SQUARES	DF	MEAN SQUARE	F	PROBABILITY
BETWEEN GROUPS	0.309	2	0.154	0.946	0.440
WITHIN GROUPS	0.980	6	0.163		

MATRIX OF PAIRWISE ABSOLUTE MEAN DIFFERENCES

	1	2	3
1	0.000		
2	0.333	0.000	
3	0.433	0.100	0.000

TUKEY HSD MULTIPLE COMPARISONS

MATRIX OF PAIRWISE COMPARISON PROBABILITIES

	1	2	3
1	1.000		
2	0.598	1.000	
3	0.439	0.951	1.000

SUMMARY STATISTICS FOR DIA5

BARTLETT TEST FOR HOMOGENEITY OF GROUP VARIANCES = 0.005

APPROXIMATE F = 0.002 DF = 2, 81 PROBABILITY = 0.998

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE	SUM OF SQUARES	DF	MEAN SQUARE	F	PROBABILITY
BETWEEN GROUPS	0.412	2	0.206	0.649	0.556
WITHIN GROUPS	1.903	6	0.317		

MATRIX OF PAIRWISE ABSOLUTE MEAN DIFFERENCES

	1	2	3
1	0.000		
2	0.183	0.000	
3	0.333	0.517	0.000

TUKEY HSD MULTIPLE COMPARISONS

MATRIX OF PAIRWISE COMPARISON PROBABILITIES

	1	2	3
1	1.000		
2	0.917	1.000	
3	0.759	0.536	1.000

SUMMARY STATISTICS FOR DIA10

BARTLETT TEST FOR HOMOGENEITY OF GROUP VARIANCES = 11.132

APPROXIMATE F = 5.020 DF = 2, 81 PROBABILITY = 0.009

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE	SUM OF SQUARES	DF	MEAN SQUARE	F	PROBABILITY
BETWEEN GROUPS	0.142	2	0.071	0.771	0.503
WITHIN GROUPS	0.553	6	0.092		

MATRIX OF PAIRWISE ABSOLUTE MEAN DIFFERENCES

	1	2	3
1	0.000		
2	0.267	0.000	
3	0.000	0.267	0.000

TUKEY HSD MULTIPLE COMPARISONS

MATRIX OF PAIRWISE COMPARISON PROBABILITIES

	1	2	3
1	1.000		
2	0.562	1.000	
3	1.000	0.562	1.000

SUMMARY STATISTICS FOR DIA12

BARTLETT TEST FOR HOMOGENEITY OF GROUP VARIANCES = 12.354

APPROXIMATE F = 5.648 DF = 2, 81 PROBABILITY = 0.005

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE	SUM OF SQUARES	DF	MEAN SQUARE	F	PROBABILITY
BETWEEN GROUPS	0.247	2	0.123	0.982	0.428
WITHIN GROUPS	0.753	6	0.126		

MATRIX OF PAIRWISE ABSOLUTE MEAN DIFFERENCES

	1	2	3
1	0.000		
2	0.333	0.000	
3	0.033	0.367	0.000

TUKEY HSD MULTIPLE COMPARISONS

MATRIX OF PAIRWISE COMPARISON PROBABILITIES

	1	2	3
1	1.000		
2	0.521	1.000	
3	0.993	0.462	1.000

SUMMARY STATISTICS FOR DIA15

ONE OR MORE OF YOUR GROUPS HAS NO VARIANCE.

ANEXO XI

Estadística del recuento *E. coli* en los tres tratamientos en el Día 0

SUMMARY STATISTICS FOR DIA0

ONE OR MORE OF YOUR GROUPS HAS NO VARIANCE.

ANEXO XII**Estadística del recuento *L. plantarum* en los tres tratamientos en el Día 0 y día 15**

THE FOLLOWING RESULTS ARE FOR:

TRAT = 1.000

TOTAL OBSERVATIONS: 1

	DIA0	DIA15
N OF CASES	1	1
MEAN	.120000E+10	1200000.000
STANDARD DEV	.	.

THE FOLLOWING RESULTS ARE FOR:

TRAT = 2.000

TOTAL OBSERVATIONS: 1

	DIA0	DIA15
N OF CASES	1	1
MEAN	. 800000E+09	800000.000
STANDARD DEV	.	.

SUMMARY STATISTICS FOR DIA0ONE OR MORE OF YOUR GROUPS HAS NO VARIANCE.

SUMMARY STATISTICS FOR DIA15

ONE OR MORE OF YOUR GROUPS HAS NO VARIANCE.

ANEXO XIII**Estadística del recuento *S. carnosus* en los tres tratamientos en el Día 0 y día 15**

THE FOLLOWING RESULTS ARE FOR:

TRAT = 1.000

TOTAL OBSERVATIONS:	1	
	DIA0	DIA15
N OF CASES	1	1
MEAN	.160000E+08	16000.000
STANDARD DEV	.	.

THE FOLLOWING RESULTS ARE FOR:

TRAT = 2.000

TOTAL OBSERVATIONS:	1	
	DIA0	DIA15
N OF CASES	1	1
MEAN	9000000.000	9000.000
STANDARD DEV	.	.

SUMMARY STATISTICS FOR DIA0ONE OR MORE OF YOUR GROUPS HAS NO VARIANCE.

SUMMARY STATISTICS FOR DIA15

ONE OR MORE OF YOUR GROUPS HAS NO VARIANCE.
