



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS



“Efecto del Uso de Bactoferm™ LHP (*Pediococcus acidilactici* & *Pediococcus pentosaceus*), Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*), Bactoferm™ F-LC (*Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus* and *Staphylococcus xylosus*) y Cultivo lácteo SLB 95₃ (*Lactobacillus bulgaricus* & *Streptococcus thermophilus*) en la Elaboración de Chorizo (tipo Ambateño) Madurado”

Trabajo de Graduación, Modalidad Trabajo Estructurado de Manera Independiente Previo a la Obtención de Título de Ingeniero en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Por: Lenin Daniel Sarabia López

Tutor: Ing. Diego Salazar

Ambato – Ecuador

2011

APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de tutor del trabajo estructurado de manera independiente (TEMI) sobre el tema: “Efecto del Uso de Bactoferm™ LHP (*Pediococcus acidilactici* & *Pediococcus pentosaceus*), Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*), Bactoferm™ F-LC (*Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus* and *Staphylococcus xylosus*) y Cultivo lácteo SLB 95₃ (*Lactobacillus bulgaricus* & *Streptococcus thermophilus*) en la Elaboración de Chorizo (tipo Ambateño) Madurado”, desarrollado por el señor Lenin Daniel Sarabia López, egresado de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Considero que el mencionado trabajo de investigación reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la evaluación del jurado examinador que el H. Consejo Directivo designe:

Ambato, Septiembre de 2011

TUTOR

Ing. Diego Salazar

PROFESOR DE LA FCIAL

DECLARACIÓN, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, Lenin Daniel Sarabia López declaro que: El presente trabajo de investigación: “Efecto del Uso de Bactoferm™ LHP (*Pediococcus acidilactici* & *Pediococcus pentosaceus*), Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*), Bactoferm™ F-LC (*Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus* and *Staphylococcus xylosus*) y Cultivo lácteo SLB 95₃ (*Lactobacillus bulgaricus* & *Streptococcus thermophilus*) en la Elaboración de Chorizo (tipo Ambateño) Madurado” es absolutamente original, auténtico y personal.

En tal virtud, el contenido y efectos académicos que se desprenden del mismo son de exclusiva responsabilidad del autor.

Ambato, Septiembre de 2011

.....

Lenin Daniel Sarabia López

CI. 180386095-4

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Los miembros del Tribunal de Grado aprueban el presente Trabajo de Graduación de acuerdo a las disposiciones emitidas por la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, Septiembre de 2011

Para constancia firman:

Ing. Romel Rivera
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Mario Paredes
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Danilo Morales
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DEDICATORIA

A Dios Padre, porque sin su amor y guía en mi vida no hubiese podido llegar hasta aquí, y culminar una de las metas que me he propuesto. Por ser la parte más importante de mi vida, y enseñarme que todo lo soy y seré es: en, por y para Él.

A Jesucristo, por ser mi referente como hombre y como Hijo de Dios. Por saber que siempre ha estado conmigo, incluso en aquellos días en los que los problemas no me permitían verte. Gracias mi Señor, a ti es todo lo que soy y sin tí no soy capaz de dar un solo paso más. Te amo mi Señor y Dios.

A mi familia: mis padres Oswaldo y Rocío, mis hermanos Patricio y Favio, quienes ocupan una parte muy importante en mi mente y corazón, y me hacen sentir orgulloso de ser su hijo y hermano. Todo el tiempo invertido, las alegrías, las tristezas, los triunfos y las derrotas me han permitido finalizar un capítulo importante en mi vida: ser Ingeniero en Alimentos. Ésta es mi retribución a todo lo que han hecho por mí. Los amo mucho, gracias por todo!!

Daniel

AGRADECIMIENTO

A mi Señor Jesucristo por darle dirección a mi vida, guiando cada uno de mis pasos y dando sentido a las decisiones que he tomado. Por nunca abandonarme en aquellos momentos en los que quise rendirme.

A mis padres Oswaldo y Rocío, por la confianza y el apoyo incondicional depositados en mí, para la consecución de mis sueños y metas tanto personales como académicas.

A los Jóvenes Embajadores del Rey, quienes han influenciado de una manera muy importante en mi vida, como hermanos en Cristo, y sobre todo como amigos.

A mis amigos y compañeros de clase, por el tiempo compartido durante esta etapa de nuestras vidas; porque a pesar de nuestras diferencias hemos sabido desarrollar una amistad. Gracias por la paciencia dada a este llamíngo.

A la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, por la oportunidad de haberme capacitado en la Ciencia de los Alimentos, descubriendo la relevancia de ésta en el mundo en que vivimos.

De manera especial al Ingeniero Diego Salazar, por su apoyo tanto como maestro, así como en este último paso de mi carrera universitaria. Gracias por su ayuda, guía y orientación.

Daniel

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

RESUMEN EJECUTIVO.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	xviii

CAPÍTULO I EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 TEMA DE INVESTIGACIÓN.....	1
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.2.1 CONTEXTUALIZACIÓN	1
1.2.2 ANÁLISIS CRÍTICO	5
1.2.3 LA PROGNOSIS	8
1.2.4 LA FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	8
1.2.5 INTERROGANTES DE ESTUDIO	9
1.2.6 DELIMITACIÓN DEL OBJETO DE INVESTIGACIÓN	9
1.3 JUSTIFICACIÓN	10
1.4 OBJETIVOS	11
1.4.1 OBJETIVO GENERAL.....	11
1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	12
2.2 FUNDAMENTACIÓN FILOSÓFICA.....	15
2.3 FUNDAMENTACIÓN LEGAL.....	16
2.4 CATEGORÍAS FUNDAMENTALES.....	18
2.4.1 DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA ELABORACIÓN DE CHORIZO (tipo Ambateño) MADURADO	19
2.4.2 PROCESO DE ELABORACIÓN DE CHORIZO (TIPO AMBATEÑO) MADURADO	20
2.4.3 PRODUCTOS CÁRNICOS MADURADOS.....	23
2.4.4 CULTIVOS INICIADORES UTILIZADOS EN INDUSTRIA CÁRNICA	26
2.4.5 PROCESO DE ELABORACIÓN.....	36
2.4.6 CAMBIOS EN LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE PRODUCTOS CÁRNICOS MADURADOS.....	43
2.4.7 TIEMPO DE VIDA ÚTIL.....	52
2.4.8 SEGURIDAD BIOLÓGICA DE LOS EMBUTIDOS FERMENTADOS	53
2.4.9 CRECIMIENTO DE POBLACIONES MICROBIANAS	56
2.5 HIPÓTESIS.....	59
2.5.1 Hipótesis Nula (H_0)	59
2.5.2 Hipótesis Alternativa (H_1).....	59
2.6 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES DE LA HIPÓTESIS.....	60
2.6.1 Variable Independiente.....	60

2.6.2	Variable Dependiente	60
-------	----------------------------	----

CAPÍTULO III METODOLOGÍA

3.1	ENFOQUE	61
3.2	MODALIDAD BÁSICA DE LA INVESTIGACIÓN	61
3.3	NIVEL O TIPO DE INVESTIGACIÓN	62
3.4	EXPERIMENTACIÓN	62
3.5	POBLACIÓN Y MUESTRA	65
3.6	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	66
3.7	RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN	68
3.8	PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS	68

CAPÍTULO IV ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	70
4.2	INTERPRETACIÓN DE DATOS	70
4.2.1	Materia prima.....	70
4.2.2	Respuestas experimentales	71
4.2.3	Tiempo de vida útil.....	83
4.2.4	Cinética de crecimiento microbiano del tratamiento a ₁ b ₁ : Bactoferm™ F-RM-52 (<i>Lactobacillus curvatus</i> & <i>Staphylococcus</i> <i>carneus</i>) – 24 horas estufaje	85
4.2.5	Rendimiento de chorizo (tipo Ambateño) madurado con Bactoferm™ F-RM-52 (<i>Lactobacillus curvatus</i> & <i>Staphylococcus</i> <i>carneus</i>) – 24 horas estufaje	92
4.2.6	Estimación económica.....	93
4.3	VERIFICACIÓN DE LA HIPÓTESIS	93

CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1	CONCLUSIONES	95
5.2	RECOMENDACIONES.....	99

CAPÍTULO VI PROPUESTA

6.1	DATOS INFORMATIVOS	102
6.2	ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA.....	102
6.3	JUSTIFICACIÓN.....	104
6.4	OBJETIVOS.....	105
6.4.1	Objetivo General.....	105
6.4.2	Objetivos Específicos	106
6.5	ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD.....	106

6.6	FUNDAMENTACIÓN	106
6.7	METODOLOGÍA	110
6.8	ADMINISTRACIÓN	111
6.9	PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN	112

CAPÍTULO VII
BIBLIOGRAFÍA

7.1	LIBROS.....	113
7.2	JOURNALS.....	114
7.3	TESIS	115
7.4	INTERNET	116

ÍNDICE DE CUADROS Y GRÁFICOS

Tabla 1: Requisitos Microbiológicos para productos cárnicos curados – madurados.....	16
Tabla 2: Clasificación de embutidos fermentados (según Lücke, 1985).	25
Tabla 3: Clasificación de embutidos fermentados (según Roca e Incze, 1990).....	26
Tabla 4: Tipos de embutidos fermentados (modificado por Zeuthen, 1995 de Adams, 1986).....	26
Tabla 5: Microorganismos usados como cultivos iniciadores para embutidos crudos curados (Hammes <i>et al.</i> , 1990).	29
Tabla 6. Reporte de ocho tratamientos producto de la combinación de los factores A y B.....	63
Tabla 7. Distribución de las muestras para los catadores según el diseño de bloques incompletos para ocho (8) tratamientos.	65
Tabla 8: Formulación para Chorizo (tipo Ambateño) madurado.	69
Tabla 9: Modelo Operativo (Plan de Acción)	110
Tabla 10: Administración	111
Tabla 11: Previsión de la evaluación.....	112
Gráfico 1. “Escaso Uso de Cultivos Iniciadores en la Elaboración de Productos Cárnicos Madurados”.....	6
Gráfico 2. Red de inclusiones conceptuales.	18
Gráfico 3. Diagrama de Flujo para la Elaboración de Chorizo (tipo Ambateño) madurado.	19
Gráfico 4. Interacciones entre BAL y CGC+ que se establecen durante la fermentación de los productos cárnicos (Buckenhüskes, 1993).	36
Cuadro 1. “Variable Independiente: “Efecto del Uso de Bactoferm™ LHP (<i>Pediococcus acidilactici</i> & <i>Pediococcus pentosaceus</i>), Bactoferm™ F-RM-52 (<i>Lactobacillus curvatus</i> & <i>Staphylococcus carnosus</i>), Bactoferm™ F-LC (<i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> and <i>Staphylococcus xylosus</i>) y Cultivo lácteo SLB 95 ₃ (<i>Lactobacillus bulgaricus</i> & <i>Streptococcus thermophilus</i>)”	66
Cuadro 2. “Variable Dependiente: “Elaboración de Chorizo (tipo Ambateño) madurado”	67

ANEXO A

RESPUESTAS EXPERIMENTALES

Tabla A-1. Cambios de pH de los tratamientos experimentales durante el proceso de fermentación y maduración.

Tabla A-2. Consumo de NaOH 0,1N (ml) de los tratamientos experimentales durante el proceso de fermentación y maduración.

Tabla A-3. Peso (g) de los tratamientos experimentales durante el proceso de fermentación y maduración.

Tabla A-4. Cambios de acidez titulable (% ácido láctico) de los tratamientos experimentales durante el proceso de fermentación y maduración.

Tabla A-5. Pérdida de peso (%) de los tratamientos experimentales durante el proceso de fermentación y maduración.

Tabla A-6. Respuesta de evaluación sensorial del tratamiento a_0b_0 (Bactoferm™ LHP – 16 horas estufaje)

Tabla A-7. Respuesta de evaluación sensorial del tratamiento a_0b_1 (Bactoferm™ LHP – 24 horas estufaje)

Tabla A-8. Respuesta de evaluación sensorial del tratamiento a_1b_0 (Bactoferm™ F-RM-52 – 16 horas estufaje)

Tabla A-9. Respuesta de evaluación sensorial del tratamiento a_1b_1 (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje)

Tabla A-10. Respuesta de evaluación sensorial del tratamiento a_2b_0 (Bactoferm™ F-LC – 16 horas estufaje)

Tabla A-11. Respuesta de evaluación sensorial del tratamiento a_2b_1 (Bactoferm™ F-LC – 24 horas estufaje)

Tabla A-12. Respuesta de evaluación sensorial del tratamiento a_3b_0 (Cultivo lácteo SLB 95₃ – 16 horas estufaje)

Tabla A-13. Respuesta de evaluación sensorial del tratamiento a_3b_1 (Cultivo lácteo SLB 95₃ – 24 horas estufaje)

Tabla A-14. Análisis microbiológico del tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje) a_1b_1 a 30 días de proceso

Tabla A-15. Composición proximal del tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje) a_1b_1

Tabla A-16. Número de colonias del iniciador Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*) en tratamiento a_1b_1

Tabla A-17. Desarrollo microbiano [ufc/g] del iniciador Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*) en tratamiento a_1b_1

Tabla A-18. Porcentaje de rebanabilidad del tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje) a_1b_1

ANEXO B ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tabla B-1. Análisis de varianza para pH - Suma de cuadrados Tipo III de los tratamientos experimentales a las 24 horas de fermentación

Tabla B-2. Pruebas de múltiple rangos para pH por factor A (Tipo de Cultivo Iniciador) Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD de los tratamientos experimentales a las 24 horas de fermentación

Tabla B-3. Análisis de varianza para Acidez [g ácido láctico/100 g] - Suma de cuadrados Tipo III de los tratamientos experimentales a las 120 horas de maduración

Tabla B-4. Pruebas de múltiple rangos para Acidez [g ácido láctico/100 g] por factor A Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD de los tratamientos experimentales a las 24 horas de maduración

Tabla B-5. Pruebas de múltiple rangos para Acidez [g ácido láctico/100 g] por factor B (Tiempo de Estufaje) Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD de los tratamientos experimentales a las 24 horas de maduración

Tabla B-6. Análisis de varianza para Pérdida de Peso [%] - Suma de cuadrados Tipo III de los tratamientos experimentales a las 120 horas de fermentación

Tabla B-7. Pruebas de múltiple rangos para Pérdida de Peso [%] por interacción AxB (Tipo de Cultivo Iniciador y Tiempo de Estufaje) Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Tabla B-8. Análisis de varianza para atributo sensorial Color - Suma de cuadrados Tipo I de los tratamientos experimentales a los 15 días de proceso

Tabla B-9. Análisis de varianza para atributo sensorial Olor - Suma de cuadrados Tipo I de los tratamientos experimentales a los 15 días de proceso

Tabla B-10. Análisis de varianza para atributo sensorial Sabor - Suma de cuadrados Tipo I de los tratamientos experimentales a los 15 días de proceso

Tabla B-11. Pruebas de múltiple rangos para Sabor por tratamientos

Tabla B-12. Análisis de varianza para atributo sensorial Aceptabilidad - Suma de Cuadrados Tipo I de los tratamientos experimentales a los 8 días de proceso

Tabla B-13. Pruebas de Múltiple Rangos para Aceptabilidad por Tratamientos

ANEXO C GRÁFICOS

Gráfico C-1. Curva de pH vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ LHP – 16 horas estufaje) a_0b_0

Gráfico C-2. Curva de pH vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ LHP – 24 horas estufaje) a_0b_1

Gráfico C-3. Curva de pH vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 16 horas estufaje) a_1b_0

Gráfico C-4. Curva de pH vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje) a_1b_1

Gráfico C-5. Curva de pH vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-LC – 16 horas estufaje) a_2b_0

Gráfico C-6. Curva de pH vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-LC – 24 horas estufaje) a_2b_1

Gráfico C-7. Curva de pH vs Tiempo [h] en tratamiento (Cultivo lácteo SLB 95₃ – 16 horas estufaje) a_3b_0

Gráfico C-8. Curva de pH vs Tiempo [h] en tratamiento (Cultivo lácteo SLB 95₃ – 24 horas estufaje) a_3b_1

Gráfico C-9. Curva de Acidez [g ácido láctico/100 g] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ LHP – 16 horas estufaje) a_0b_0

Gráfico C-10. Curva de Acidez [g ácido láctico/100 g] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ LHP – 24 horas estufaje) a_0b_1

Gráfico C-11. Curva de Acidez [g ácido láctico/100 g] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 16 horas estufaje) a_1b_0

Gráfico C-12. Curva de Acidez [g ácido láctico/100 g] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje) a_1b_1

Gráfico C-13. Curva de Acidez [g ácido láctico/100 g] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-LC – 16 horas estufaje) a_2b_0

Gráfico C-14. Curva de Acidez [g ácido láctico/100 g] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-LC – 24 horas estufaje) a_2b_1

Gráfico C-15. Curva de Acidez [g ácido láctico/100 g] vs Tiempo [h] en tratamiento (Cultivo lácteo SLB 95₃ – 16 horas estufaje) a_3b_0

Gráfico C-16. Curva de Acidez [g ácido láctico/100 g] vs Tiempo [h] en tratamiento (Cultivo lácteo SLB 95₃ – 24 horas estufaje) a_3b_1

Gráfico C-17. Curva de Pérdida de peso [%] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ LHP – 16 horas estufaje) a_0b_0

Gráfico C-18. Curva de Pérdida de peso [%] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ LHP – 24 horas estufaje) a_0b_1

Gráfico C-19. Curva de Pérdida de peso [%] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 16 horas estufaje) a_1b_0

Gráfico C-20. Curva de Pérdida de peso [%] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje) a_1b_1

Gráfico C-21. Curva de Pérdida de peso [%] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-LC – 16 horas estufaje) a_2b_0

Gráfico C-22. Curva de Pérdida de peso [%] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-LC – 24 horas estufaje) a_2b_1

Gráfico C-23. Curva de Pérdida de peso [%] vs Tiempo [h] en tratamiento (Cultivo lácteo SLB 95₃ – 16 horas estufaje) a_3b_0

Gráfico C-24. Curva de Pérdida de peso [%] vs Tiempo [h] en tratamiento (Cultivo lácteo SLB 95₃ – 24 horas estufaje) a_3b_1

Gráfico C-25. Promedio de evaluación sensorial del atributo Color de los tratamientos experimentales

Gráfico C-26. Promedio de evaluación sensorial del atributo Olor de los tratamientos experimentales

Gráfico C-27. Promedio de evaluación sensorial del atributo Sabor de los tratamientos experimentales

Gráfico C-28. Promedio de evaluación sensorial del atributo Aceptabilidad de los tratamientos experimentales

Gráfico C-29. Zona lineal de Pérdida de peso [%] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje) a_1b_1

Gráfico C-30. Curva de crecimiento de *Staphylococcus carnosus* [\log_{10} ufc/g] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje) a_1b_1

Gráfico C-31. Curva de crecimiento de *Staphylococcus carnosus* [ufc/g] vs Tiempo [h] en escala semilogarítmica en tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje) a_1b_1

Gráfico C-32. Logaritmo de base 10 de zona de crecimiento DE *Staphylococcus carnosus* [\log_{10} ufc/g] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje) a_1b_1

Gráfico C-33. Zona de crecimiento de *Staphylococcus carnosus* [ufc/g] vs Tiempo [h] en escala semilogarítmica en tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje) a_1b_1

Gráfico C-34. Curva de crecimiento de *Lactobacillus curvatus* [\log_{10} ufc/g] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje) a_1b_1

Gráfico C-35. Curva de crecimiento de *Lactobacillus curvatus* [ufc/g] vs Tiempo [h] en escala semilogarítmica en tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje) a_1b_1

Gráfico C-36. Logaritmo de base 10 de zona de crecimiento de *Lactobacillus curvatus* [\log_{10} ufc/g] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje) a_1b_1

Gráfico C-37. Zona de crecimiento de *Lactobacillus curvatus* [\log_2 ufc/g] vs Tiempo [h] en escala semilogarítmica en tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje) a_1b_1

ANEXO D FOTOGRAFÍAS

Fotografía D-1. Molino industrial de carne

Fotografía D-2. Embutidora manual de carne

Fotografía D-3. Cámara de maduración

Fotografía D-4. Horno ahumador industrial

Fotografía D-5. Tratamientos experimentales a cero horas de proceso

Fotografía D-6. Curado de tratamientos experimentales a 24 horas de proceso

Fotografía D-7. Tratamientos experimentales en cámara de maduración a las 72 horas

Fotografía D-8. Tratamientos experimentales a las 96 horas de proceso

Fotografía D-9. Presencia de hongos filamentosos en la superficie de tratamientos experimentales a 120 horas

Fotografía D-10. Colonias de *Lactobacillus curvatus* en medio Agar Rogosa Man dilución $1/10^4$ en tratamiento a_1b_1

Fotografía D-11. Ausencia de colonias de *Staphylococcus aureus* en medio Agar Manitol Sal Rojo Congo dilución $1/10$ en tratamiento a_1b_1

Fotografía D-12. Colonias de *Staphylococcus carnosus* en medio de cultivo Agar Baird Parker dilución $1/10^3$ en tratamiento a_1b_1

Fotografía D-13. Observación microscópica de micelios e hifas de *Penicillium* sp. desarrollado en la superficie del producto elaborado (400x)

Fotografía D-14. Observación microscópica de micelios e hifas de *Penicillium* sp. desarrollado en la superficie del producto elaborado (400x)

**ANEXO E
FICHA TÉCNICA DE ANÁLISIS SENSORIAL**

**ANEXO F
PROTOCOLOS DE ANÁLISIS**

ANEXO F-1: DETERMINACIÓN PORCENTAJE DE PÉRDIDA DE PESO

ANEXO F-2: DETERMINACIÓN DE ACIDEZ TITULABLE

ANEXO F-3: DETERMINACIÓN DE Coliformes totales/*Escherichia coli*

ANEXO F-4: DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE *Salmonella* sp.

ANEXO F-5: DETERMINACIÓN DE *Staphylococcus aureus*

ANEXO F-6: DETERMINACIÓN DE *Clostridium perfringens*

ANEXO F-7: DETERMINACIÓN DE *Lactobacillus curvatus*

ANEXO F-8: DETERMINACIÓN DE *Staphylococcus carnosus*

**ANEXO G
ESTIMACIÓN ECONÓMICA**

Tabla G-1. Materiales directos e indirectos

Tabla G-2. Equipos y utensilios

Tabla G-3. Suministros

Tabla G-4. Personal

Tabla G-5. Inversión estimada para el procesamiento de chorizo (tipo Ambateño) madurado

**ANEXO H
BALANCE DE MATERIALES**

Diagrama H-1. Balance de materiales de elaboración de Chorizo (tipo Ambateño) madurado

**ANEXO I
HOJAS Y FICHAS TÉCNICAS**

RESUMEN EJECUTIVO

Los productos cárnicos madurados se han elaborado durante muchos años de forma artesanal y por tanto, han estado sujetos a problemas de producción derivados de la falta de conocimiento científico. Durante los últimos años, la biotecnología de alimentos se ha especializado en la adaptación de los procesos tradicionales para la producción industrial a gran escala. Los microorganismos competitivos típicos de los procesos modernos han sido aislados y desarrollados como cultivos iniciadores, por su poder fermentador y acidificante; esto ha permitido a la industria satisfacer la creciente demanda de los consumidores de productos seguros con unos costos asequibles. De tal manera, se evaluó el efecto del uso de cultivos iniciadores: Bactoferm™ LHP (*Pediococcus acidilactici* & *Pediococcus pentosaceus*), Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*), Bactoferm™ F-LC (*Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus* and *Staphylococcus xylosus*) y Cultivo lácteo SLB 95₃ (*Lactobacillus bulgaricus* & *Streptococcus thermophilus*) y tiempos de estufaje de 16 y 24 horas, en la elaboración de chorizo (tipo Ambateño) madurado.

Aplicando un diseño experimental AxB se obtuvo ocho tratamientos experimentales, combinando el tipo de cultivo iniciador y tiempo de estufaje aplicado a los tratamientos. Para su fabricación se utilizó la tecnología de elaboración chorizo (tipo Ambateño) adaptándola a la obtención de un producto madurado, controlándose parámetros ambientales de temperatura y humedad relativa durante las etapas de estufaje, maduración y secado.

Además, durante las etapas de estufaje, maduración y secado se efectuó mediciones de pérdida de peso, descenso de pH, incremento en acidez titulable de los tratamientos experimentales.

Análisis microbiológicos de microorganismos contaminantes y patogénicos del mejor tratamiento a los 30 días de elaboración, confirmó la calidad e inocuidad del producto cárnico, al evidenciar la ausencia de

desarrollo de microorganismos como: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens*.

Mediante pruebas de análisis sensorial, análisis de varianza de descenso de pH a las 24 horas de estufaje, se estableció el mejor tratamiento entre los que fueron objeto de estudio. De los resultados de estos análisis se estableció que el mejor de éste estudio es aquel tratamiento que combina el uso de Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*) con 24 horas de estufaje.

Por otro lado se efectuó el análisis de cinética de desarrollo de los microorganismos: *Lactobacillus curvatus* y *Staphylococcus carnosus*, durante las etapas de estufaje, fermentación y secado. Se determinó que *Lactobacillus curvatus* presenta un tiempo de generación de 6,01 horas, mientras que *Staphylococcus carnosus* un tiempo de 17,00 horas, lo cual confirma el marcado descenso de pH acaecido en el tratamiento experimental por la producción de ácido láctico.

De igual manera se realizó el análisis proximal del mejor tratamiento de chorizo (tipo Ambateño) madurado, determinándose un valor de 14,10% de proteína; 27,47% de grasa; 35,98% de humedad y 5,95% de cenizas. Cumpliéndose el requisito mínimo de proteína exigido por la legislación ecuatoriana.

Asimismo se realizó el análisis económico del mejor tratamiento, dando como resultado un valor de 3,09 USD para 250 gramos de producto elaborado, que al compararse con productos similares en el mercado (salami "Don Diego" costo de 3,15 USD por 200 gramos), resulta rentable de elaborarse.

El valor agregado añadido a un producto tan tradicional como lo es chorizo (tipo Ambateño) permitiría el desarrollo de nuevos hábitos de consumo, por el notable mejoramiento de la calidad sensorial e inocuidad del producto, satisfaciendo los requerimientos del consumidor.

INTRODUCCIÓN

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

Los embutidos fermentados son productos tradicionales de la Europa central y meridional que se originaron probablemente en la cuenca mediterránea. La historia de la conservación de la carne a través de la fermentación ha sido estudiada en detalle por Leistner (1986) y Zeuthen (1995).

Estos productos se caracterizan porque se consumen crudos, se conservan sin necesidad de refrigeración y tienen un tiempo de vida útil muy largo. Además poseen unas características organolépticas muy apreciables, destacando su color rojo, consistencia, aroma y sabor típicos.

No obstante, la elaboración de embutidos fermentados varía sustancialmente de unos países a otros e incluso existen diferencias entre regiones dentro del mismo país. Esto se debe básicamente a variaciones en la composición de los embutidos y a la tecnología de elaboración. Según Leistner (1986), la producción de embutidos fermentados crudos curados involucra una tecnología imprecisa que permite grandes variaciones siempre que se mantenga el concepto básico de proporcionar una adecuada reducción del pH y/o de la actividad de agua (a_w), además afirma que deben cometerse graves errores en la fabricación para que se obtengan productos defectuosos.

La obtención de un embutido fermentado de calidad requiere un proceso fermentativo en el que se produce un descenso del pH y una etapa de maduración en la que se desarrollan el aroma y textura típicos como consecuencia de los numerosos procesos químicos y enzimáticos que tienen

lugar. También es imprescindible la subsiguiente fase de desecación, ya que en ella se produce una reducción de la a_w que en combinación con la disminución del pH hace que el embutido adquiera su capacidad de conservación, además de la consistencia adecuada (Frey, 1983).

Los microorganismos desempeñan un papel decisivo en la fabricación de embutidos fermentados, ya que están directamente implicados en la reducción de nitratos a nitritos, el descenso de pH, la formación del aroma, la estabilidad del color y la capacidad de conservación del producto. Sin embargo, no todos los microorganismos presentes en las materias primas contribuyen a la maduración prevista, y algunos de ellos pueden derivarla hacia una dirección indeseable. Para corregir posibles defectos en la maduración del producto en numerosas ocasiones se opta por utilizar cultivos de microorganismos seleccionados que influyen de manera beneficiosa sobre la fermentación del embutido además de inhibir el desarrollo de la microbiota acompañante que normalmente llega a la masa del embutido procedente de la materia prima o en el transcurso de la fabricación (Frey, 1983).

Son numerosos los géneros microbianos utilizados en la composición de los cultivos iniciadores. Aunque los más empleados pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas y las micrococáceas, se ha propuesto la utilización de otros géneros bacterianos como *Escherichia*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Corynebacterium* (Pätäja, 1977). También se utilizan determinadas especies de levaduras y mohos como flora de superficie, aunque la finalidad en este caso es fundamentalmente de aromatización y mejora de la apariencia externa.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

2.1.1. TEMA DE INVESTIGACIÓN

“Efecto del Uso de Bactoferm™ LHP (*Pediococcus acidilactici* & *Pediococcus pentosaceus*), Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*), Bactoferm™ F-LC (*Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus* and *Staphylococcus xylosus*) y Cultivo lácteo SLB 95₃ (*Lactobacillus bulgaricus* & *Streptococcus thermophilus*) en la Elaboración de Chorizo (tipo Ambateño) Madurado”

2.1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.2.1. CONTEXTUALIZACIÓN

- **Contextualización Macro**

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

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

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

Los embutidos fermentados son productos tradicionales de la Europa central y meridional que se originaron probablemente en la cuenca mediterránea. La historia de la conservación de la carne a través de la fermentación ha sido estudiada en detalle por Leistner (1986) y Zeuthen (1995). Sabemos, por ellos, que en la Roma imperial era frecuente el consumo de embutidos y de jamones, algunos llegados de los valles pirenaicos y, en especial, de la Cerdeña.

Aparentemente, el clima templado con viento y lluvias moderadas de los países mediterráneos favorece la curación de los embutidos. En otros países europeos, sin embargo, la forma tradicional de preservación de la carne consistió en el salado y secado de la carne sin picar. En Alemania, la manufactura de embutidos fermentados comenzó hace sólo unos 160 años y mayoritariamente se trata de embutidos fermentados ahumados; en Italia, Francia y España, predominan los embutidos picantes y secados al aire.

En Europa para la elaboración de embutidos fermentados se empleaban métodos tradicionales de trabajo intensivo, pero en Estados Unidos con el desarrollo de una industria cárnica a gran escala determinó un alto nivel de automatización. Es así que por la década de los 40's se hicieron los primeros esfuerzos para establecer las bases científicas del proceso de fermentación, siguiendo el desarrollo de cultivos iniciadores (Varman y Sutherland, 1998).

El primer cultivo iniciador que apareció en el mercado, con aplicación en la industria cárnica, fue una cepa de *Pediococcus cerevisiae* (Niven *et al.*, 1959) que comercializó la firma Merck en Estados Unidos en 1957 para la elaboración de embutidos de verano y embutidos untables.

La utilización de cultivos iniciadores en la industria cárnica está ampliamente difundida. Los cultivos iniciadores, según la definición de Leistner y Echardt (1979), son microorganismos que se presentan en estado puro o mixto, seleccionados de acuerdo con sus propiedades específicas y que se agregan a los alimentos con objeto de mejorar su aspecto, aroma y sabor, así como la conservación de los mismos. Los microorganismos añadidos se instauran como flora predominante dirigiendo la fermentación y excluyendo a la flora indeseable, así se reducen los riesgos higiénicos y de fabricación por deficiencias de origen microbiano.

Los microorganismos empleados por la biotecnología de productos cárnicos fermentados son muy diversos, pero sus roles están claramente definidos por las etapas del proceso tecnológico; por lo tanto, contribuyen a la especificidad del producto final. Dependiendo de la principal acción tomada, los cultivos iniciadores pueden ser categorizados como: cultivos acidificantes, cultivos para la formación de color y sabor, cultivos para cobertura de superficie o cultivos para bioprotección. (Roman *et al.*, 2006).

- **Contextualización Meso.**

Actualmente Chile es el país de mayor consumo de cecinas y embutidos en América del Sur, llegando a los 15 Kg. per cápita en el año 2008 y con un crecimiento anual cercano al 4,4%. (INE, 2009). Salchichas, mortadelas, jamones, longanizas, hamburguesas, entre otros productos, conforman la producción nacional, que para este año se calcula en alrededor de las 244 mil toneladas, de esta producción el 80% es aporte de 5 empresas nacionales consolidadas en el país. El 20% de la producción restante es aporte del sector de las micro, pequeñas y medianas empresas dedicadas a la elaboración de embutidos crudos y cocidos que en su totalidad alcanzan una cifra superior 180 fábricas repartidas en todo el territorio nacional, se suma a este factor todo lo que se transa en el mercado informal, que no está normado ni legalizado y no cumple con la normativa legal vigente (VARGAS, C. 2009).

El primer cultivo cárnico iniciador en Europa -un cultivo de *Micrococcaceae* puro utilizado para el desarrollo de sabor y color-, comenzó a ser comercializado en 1961 por la compañía alemana Rudolph Müller. Unos años después, los cultivos cárnicos iniciadores se desarrollaron con cultivos mixtos, compuestos por bacterias ácido-lácticas y *Staphylococci*. No obstante, la utilización de cultivos iniciadores en la industria cárnica en América Latina para productos secos y curados es un concepto comercial relativamente nuevo en comparación con los cultivos lácticos (Compañía ARYZA, 2010).

Además cabe indicar, en América Latina el consumo de embutidos madurados no ha sido de gran realce. Los principales lugares donde se elaboran embutidos madurados están ubicados en la parte sur de Sudamérica, principalmente en localidades de Argentina y Chile, y en menor instancia en otros países de la región. La elaboración de embutidos madurados está dada por empresas privadas, donde se fabrican productos cárnicos, entre los cuales podemos encontrar los embutidos semi-secos y secos.

Por otro lado, la Compañía Argentina ARYZA menciona que: “en los últimos tiempos hemos notado un aumento de la demanda en el mercado. Sobre todo a partir de que los productos importados se han vuelto tan caros” (Compañía ARYZA, 2010). Lo que ha impulsado el desarrollo de industrias distribuidoras de cultivos iniciadores, tanto el sector lácteo como en el cárnico en América Latina. Impulsado, por lo tanto, en los últimos años una nueva línea de alimentos funcionales, productos alimenticios que, además de su valor nutritivo intrínseco, ayudan a mantener el estado de salud general del organismo y a la vez pueden tener un efecto benéfico adicional, terapéutico o preventivo en el consumidor.

- **Contextualización Micro.**

Según una investigación realizada a las más importantes empresas de embutidos del país ejecutada por diario HOY el 25 de Octubre del 2007, determinan que el negocio de los embutidos mueve unos \$120 millones al

año, que el consumo anual en el Ecuador es de 3 kilos por persona y que la demanda crece a una tasa del 5%.

Si bien no hay cifras exactas sobre el consumo de embutidos a escala nacional, un estudio de Ipsa Group, realizado en Quito y en Guayaquil, determina que, entre las dos ciudades, la primera concentra el 52%. Sin embargo, los hábitos de consumo en estas urbes son diferentes. En Guayaquil se consume más mortadela (un 37%) y en Quito, salchichas (63%).

No es suficiente que el embutido sea nutricionalmente aceptable, este debe cumplir con características de calidad y aceptación como: textura, apariencia, color, sabor, etc., (Diario HOY, 2007).

En Ecuador el mercado de embutidos se encuentra distribuido de la siguiente manera: Funcionan más de 300 fábricas, de las cuales solo 30 están legalmente constituidas. En el sector laboran 25 000 personas de forma directa. Ecuador produce mortadelas, jamones salchichas, chorizos, vienesa, paté. De estos productos, las más apetecidas son las mortadelas y las salchichas. Ambas variedades representan el 75% de la producción nacional. Le siguen el chorizo con 14%, jamón con 5% y el 6% restante pertenece a otras presentaciones.

Según la empresa Embutidos Don Diego, señalan que en Ecuador se producen de 36 millones a 50 millones de kilos de embutidos anualmente; es decir, cada ecuatoriano consume de 2,77 a 3,85 kilos cada año. Éste margen es amplio y obedece a la cantidad de empresas que no están reguladas y no se puede tener una cifra concreta. (Prochile, 2007).

Sin embargo, en el mercado local la producción de embutidos madurados está a cargo del sector privado, debido a la facilidad que tienen las empresas para adquirir cultivos iniciadores y al disponer de cámaras de maduración con control de humedad relativa y aireación.

Árbol de problemas.

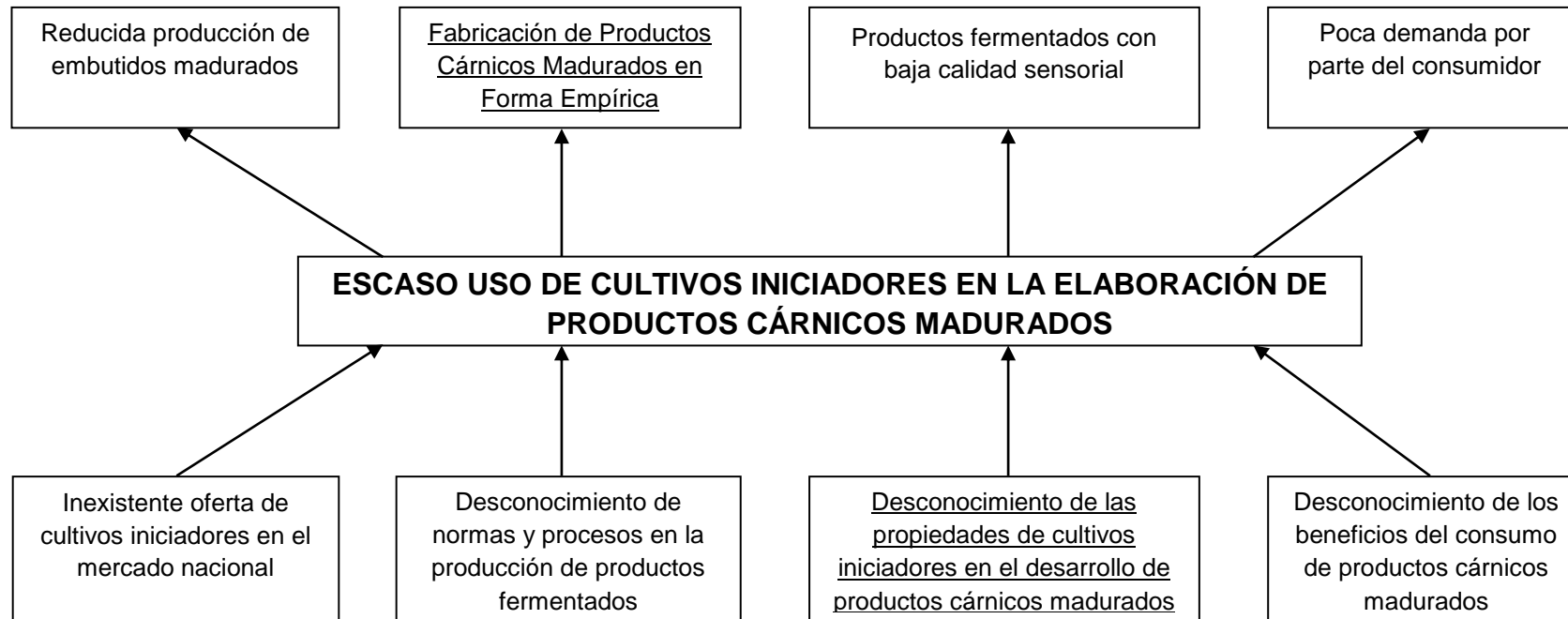


Gráfico 1. “Escaso Uso de Cultivos Iniciadores en la Elaboración de Productos Cárnicos Madurados”

Elaborado por: Lenin Daniel Sarabia, 2011

1.2.2. ANÁLISIS CRÍTICO

En Ecuador gran parte de los embutidos cárnicos de consumo interno son elaborados por pequeños productores, tal como es el caso de los embutidos crudos. Dentro de los que se puede mencionar a los productos crudo-curado-madurados. Estos embutidos pueden ser elaborados mediante el empleo de microorganismos seleccionados, conocidos como iniciadores, los que mejoran las etapas de fermentación y secado del producto. No obstante, la inexistente oferta de cultivos iniciadores en el mercado ecuatoriano ha dado como resultado una reducida producción de embutidos madurados y además ésta producción es realizada de forma muy tradicional.

Asimismo, la reducida cantidad de embutidos madurados que es producida en el país presenta un escaso desarrollo de las características sensoriales. Lo anterior ocurre debido al desconocimiento de las propiedades y efectos de los cultivos iniciadores en la elaboración de productos cárnicos. Consecuentemente, el desarrollo organoléptico del producto así elaborado queda supeditado a la microflora nativa del producto, la cual puede llegar a ser muy variada en función a las precauciones tomadas o no durante el proceso de elaboración del producto.

Además, la producción tradicional y empírica de productos cárnicos madurados es debida también a que la gran mayoría de los productores no disponen de un conocimiento adecuado respecto a normas y procesos correctos de producción. Por lo tanto, en la elaboración de éste tipo de productos se ve incrementado el riesgo del desarrollo de microorganismos contaminantes, debido a que no hay un adecuado control durante las etapas de fermentación y secado.

Por otro lado, si bien hay una reducida producción de embutidos madurados en el mercado local, se debe considerar que también existe una escasa cultura de consumo de productos cárnicos madurados, que se asume es debida al desconocimiento de las características que presentan éste tipo de productos.

En consecuencia, el trabajo de investigación buscó estudiar el efecto de la utilización de microorganismos iniciadores en la elaboración de chorizo (tipo ambateño) madurado con la finalidad de mejorar las características de éste producto que es de gran consumo local.

1.2.3. PROGNOSIS

El gran avance dado en los últimos años en el desarrollo y mejoramiento de tecnologías de obtención y utilización de cultivos microbianos en la elaboración de alimentos, ha provocado el incremento de la seguridad alimentaria en productos fermentados – como embutidos madurados – por la inhibición del crecimiento de microbiota contaminante, así como el potenciamiento de las características sensoriales del producto alimenticio.

Por lo tanto, al no utilizarse cultivos microbianos en la elaboración de chorizo (tipo ambateño) madurado no se podrá mejorar los procesos de producción de embutidos madurados, incrementando los riesgos de contaminación microbiana en productos cárnicos fermentados por prácticas inadecuadas de elaboración.

Asimismo, se provocará el retardo en el desarrollo de nuevas tecnologías de elaboración de embutidos cárnicos crudos madurados a nivel de pequeñas empresas, por la no utilización y manejo adecuados de cultivos iniciadores.

Además, la no utilización de cultivos iniciadores tendrá un impacto negativo en la economía de los pequeños productores de embutidos crudos curados ya que al confiar en los procesos naturales de fermentación se incrementa el riesgo del desarrollo de microflora patógena en la mezcla cárnica, con la probable pérdida de características organolépticas y de inocuidad del producto y, por ende la pérdida de nichos de mercado que afecta la economía del pequeño productor.

1.2.4. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

El trabajo de investigación se basó en el estudio “Efecto del Uso de Bactoferm™ LHP (*Pediococcus acidilactici* & *Pediococcus pentosaceus*),

Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*), Bactoferm™ F-LC (*Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus* and *Staphylococcus xylosus*) y Cultivo lácteo SLB 95₃ (*Lactobacillus bulgaricus* & *Streptococcus thermophilus*) en la Elaboración de Chorizo (tipo Ambateño) Madurado”

Variable Independiente:

Efecto del uso de Bactoferm™ LHP (*Pediococcus acidilactici* & *Pediococcus pentosaceus*), Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*), Bactoferm™ F-LC (*Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus* and *Staphylococcus xylosus*) y cultivo lácteo SLB 95₃ (*Lactobacillus bulgaricus* & *Streptococcus thermophilus*)

Variable Dependiente:

Elaboración de chorizo (tipo Ambateño) madurado

1.2.5. INTERROGANTES DE ESTUDIO

¿Cómo afecta el empleo de microorganismos iniciadores en la elaboración de chorizo (tipo Ambateño) madurado?

¿Qué factores afectan el adecuado desarrollo de microorganismo iniciadores en un producto cárnico madurado?

¿Cómo afecta el tipo de microorganismos iniciadores el desarrollo de características sensoriales de un producto cárnico madurado?

¿Existe inhibición de microbiota contaminante al emplearse microorganismos iniciadores en la elaboración de un producto cárnico madurado?

¿La temperatura de estufaje condiciona el descenso de pH, acidez y tiempo de secado de un producto cárnico madurado?

1.2.6. DELIMITACIÓN DEL OBJETO DE INVESTIGACIÓN

Categoría: Alimentos
Subcategoría: Tecnología de cárnicos
Área: Embutidos madurados

Subárea:	Chorizo (tipo Ambateño) madurado
Temporal:	El trabajo fue investigado durante el año 2011. Tiempo de investigación: marzo 2011 a julio 2011.
Espacial:	El trabajo de investigación se ejecutó en la Universidad Técnica de Ambato a través de los Laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

2.1.3. JUSTIFICACIÓN

El empleo de microorganismos iniciadores en la elaboración de alimentos, es una práctica que ha cobrado fuerza en los últimos años. Especialmente, su utilización en la elaboración de productos cárnicos madurados debido a que desarrollan y mejoran las características funcionales de la carne.

Además, la base de la amplia variedad de embutidos crudos curados fermentados que existen en el mercado radica en una tecnología de fabricación flexible que permite realizar muchas modificaciones siempre que se mantengan las reducciones adecuadas de pH y a_w (Leistner, 1992).

Por lo tanto, éste trabajo de investigación presenta una importancia práctica por cuanto se buscó aplicar microorganismos que ayuden a controlar adecuadamente el proceso de fermentación y maduración de chorizo (tipo ambateño) madurado de forma que se consiga estandarizar el proceso y la calidad del producto elaborado.

El interés de estudiar el efecto del uso de microorganismos iniciadores en la elaboración de chorizo (tipo ambateño) madurado, se basó también en el alto consumo que éste producto tiene en la localidad, siendo parte intrínseca de la gastronomía del sector. Por lo tanto, el cambio de las preferencias de consumo hacia productos de tipo madurado, los cuales no requieren tratamientos térmicos para su consumo.

Así mismo, los datos experimentales a obtenerse tendrán un impacto directo en la correcta elaboración de éste producto, en términos de calidad organoléptica y microbiológica; por ende la disponibilidad de ésta

información permitirá a los productores mejorar las condiciones de cada una de las etapas de elaboración para que el chorizo (tipo ambateño) madurado mantenga sus características. Es decir, el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan diversificar el amplio grupo de productos cárnicos disponibles en el mercado.

2.1.4. OBJETIVOS

1.4.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto del uso de Bactoferm™ LHP (*Pediococcus acidilactici* & *Pediococcus pentosaceus*), Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*) y Bactoferm™ F-LC (*Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus* and *Staphylococcus xylosus*) en la elaboración de chorizo (tipo Ambateño) madurado.

1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el pH, acidez titulable y pérdida de peso de chorizo (tipo Ambateño) madurado durante el proceso de fermentación y secado.
- Analizar estadísticamente las características organolépticas de chorizo (tipo Ambateño) madurado mediante la aplicación de pruebas de análisis sensorial.
- Establecer la calidad microbiológica del mejor tratamiento de chorizo (tipo Ambateño) madurado mediante el análisis microbiológico de coliformes totales/*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus*.
- Determinar la cinética de crecimiento de los microorganismos iniciadores presentes en el mejor tratamiento de chorizo (tipo Ambateño) madurado.
- Proponer la elaboración de chorizo (tipo Ambateño) aplicando la formulación del mejor tratamiento obtenido en base a los resultados físico-químicos y organolépticos.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

De lo consultado sobre trabajos de investigación acerca de embutidos madurados publicados en la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, se ha encontrado solamente información referente a embutidos escaldados; por lo cual, los antecedentes de éste trabajo de investigación se basaron en información de fuentes externas a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Algunos autores, como Adams (1986), afirman que el origen de la producción de los embutidos reside en los países de la cuenca Mediterránea aunque existen referencias sobre la elaboración de embutidos de carne de cerdo en China hace 2.000 años.

Pederson (1979) afirma que el nombre de salami podría derivarse de la ciudad de Salamis en la costa este de Chipre aunque también sugiere que la palabra embutido se origina del latín "salsus" que etimológicamente significa carne embutida conservada por salazón. Por otro lado, Liepe (1983) se opone a esta idea y defiende que el nombre se origina de la palabra italiana "sale", que significa sal. También los romanos conocían el embutido crudo y salado al que llamaban "salsicia" o "farta salsicia" de donde provienen etimológicamente las palabras salchicha y, por su mayor calibre o grosor, salchichón.

Leistner (1986) menciona que, en América estos productos también gozan de gran difusión y tradición, y que fueron los emigrantes europeos los que establecieron la producción allí, ya que no existe información anterior sobre este tipo de alimentos. Estas influencias europeas también se experimentaron en Australia, Seychelles, Filipinas y Papua Nueva Guinea.

En la Orden de 27 de febrero de 1980 (BOE 21/3/80), se indica que chorizo – un tipo de producto crudo curado - consiste en la mezcla de carnes picadas o troceadas de cerdo o cerdo y vacuno y tocino y/o grasa de cerdo, con adición de sal, pimentón y otras especias, condimentos y aditivos autorizados, amasada y embutida en tripas naturales o artificiales, que ha sufrido un proceso de maduración-secado, con o sin ahumado, que se caracteriza por su coloración roja (con la excepción de los denominados chorizos blancos) y por su olor y gustos característicos.

Por otro lado, Leistner (1995) sugiere que cuando su fabricación depende de la acción de microorganismos (adicionados en forma de cultivos iniciadores y/o presentes en las materias primas) estos productos se denominan también embutidos fermentados. La fermentación ha sido tradicionalmente usada para lograr un efecto de preservación en los alimentos. Durante la fermentación, los productos cárnicos se tornan más estables e incrementan su seguridad como una consecuencia de diferentes barreras.

Según Juárez (2005), desde un punto de vista tecnológico, la denominación de embutido seco o curado engloba un determinado grupo de embutidos conocidos desde mucho tiempo atrás. La gran variedad que presentan se debe a los diferentes procesos de elaboración, entre los que cabe destacar dos avances tecnológicos:

- El desarrollo de la técnica de climatización que posibilita un control de la temperatura, humedad relativa y velocidad del aire durante la elaboración del embutido en cualquier época del año.
- La utilización de diversas sustancias o aditivos químicos y microbianos para la elaboración de embutidos (colorantes, aromatizantes y

saborizantes, reguladores del potencial redox, cultivos iniciadores, etc.) que favorecen la aplicación de técnicas rápidas de fabricación.

Barbuti y Parolari (2002) mencionan que los embutidos ácido-fermentados generalmente pueden ser considerados como productos de bajo riesgo como consecuencia de la reducida actividad de agua y pH (4,8 a 5,0) que inhiben bacterias patogénicas aún a temperatura ambiente.

Sanz y col. (1998), indican que entre los países mediterráneos, hay una preferencia por los embutidos secos con un limitado sabor ácido. La tecnología de embutidos fermentados de baja acidez está basada en embutidos de pequeño tamaño, y temperaturas bajas de maduración (10 a 12 ° C)) para evitar una acidificación rápida e intensa. Los valores finales de pH de ésta clase de productos están alrededor de 5,3 a 6,2.

La utilización tecnológica de cultivos iniciadores es importante en su contribución a la seguridad e higiene de los alimentos. Es bien conocido que las bacterias ácido lácticas producen una serie de sustancias antagonistas de otros grupos microbianos, que incluye productos finales del metabolismo como son ácidos orgánicos (láctico, acético y propiónico), peróxido de hidrógeno y diacetilo; así como otras sustancias de naturaleza antibiótica denominadas bacteriocinas.

Algunos investigadores como Speck (1972) apuntaron la posibilidad de conservar los alimentos mediante la adición de cultivos iniciadores o por la incorporación de los metabolitos antimicrobianos producidos por las bacterias lácticas.

Desde 1961 los cultivos iniciadores en embutidos curados han estado disponibles. Algunos de los microorganismos que en la actualidad están siendo utilizados como cultivos iniciadores, habitualmente se los encuentra en la forma de cultivos multi-cepa deshidratados congelados.

Hammes (1985), en sus investigaciones realizadas demuestra que no se hallaron fallas en cuanto a la pureza de las preparaciones de los cultivos iniciadores para embutidos curados ofrecidos en el mercado Alemán. En

consecuencia, Weber (1986) menciona que desde entonces las preparaciones de iniciadores son habitualmente usadas en grandes firmas y en pequeñas empresas que producen embutidos crudos curados

Leistner (1992) establece que la base de la amplia variedad de embutidos crudos curados fermentados que existen en el mercado radica en una tecnología de fabricación flexible que permite realizar muchas modificaciones siempre que se mantengan las reducciones adecuadas de pH y actividad de agua (a_w).

Por lo tanto, según Frey (1983) la obtención de un embutido fermentado de calidad requiere un proceso fermentativo en el que se produce un descenso del pH y una etapa de maduración en la que se desarrollan el aroma y textura típicos como consecuencia de los numerosos procesos químicos y enzimáticos que tienen lugar. También es imprescindible la subsiguiente fase de desecación, ya que en ella se produce una reducción de la a_w que en combinación con la disminución del pH hace que el embutido adquiera su capacidad de conservación, además de la consistencia adecuada.

2.2.2. FUNDAMENTACIÓN FILOSÓFICA

La investigación es una actividad que ha preocupado a filósofos y científicos porque les ha inquietado conocer el valor y sentido de su actividad, por lo tanto sus preocupaciones no han sido exclusivamente de carácter epistemológico, sino también de orden axiológico. Ambos aspectos han sido objeto de su interés incrementándose su atención en los últimos años. (Guadarrama, 2008)

En el trabajo de investigación se aplicó lógica aplicada, que corresponde a un proceso de pensamiento que analiza el contenido real de sus premisas, y conduce a una verdad material, una conclusión que sea concordante con la realidad. (El liceo digital, 2009)

La investigación recae en un principio de causalidad mismo que afirmaría que no pueden existir efectos sin causas, debido que el hombre no

creo que sabe una cosa hasta que ha entendido el por qué lo que es captar su causa primaria. (Pérez, 2005)

Históricamente ha ejercido una influencia predominante el paradigma positivista que presenta serias limitaciones, como son el extrapolar mecánicamente la metodología de la investigación científica en la naturaleza de la sociedad. Considerar que la realidad social es independiente del sujeto cognoscente, que está regida por “leyes naturales” que una vez conocidas permiten explicarla matemáticamente, predecirla y controlarla de manera exacta y precisa; que la función de la ciencia radica en realizar una descripción empírica generalizadora de las características y regularidades observables de los fenómenos, sin profundizar en sus esencias; y la absolutización de los métodos empíricos, cuantitativos, hipotéticos-deductivos en la investigación en detrimento de los cualitativos. (Pérez, 2005)

2.2.3. FUNDAMENTACIÓN LEGAL

Para la elaboración de éste producto cárnico madurado fue necesario cumplir con los requisitos establecidos en las siguientes Normas INEN:

- Norma NTE INEN 1 338:2010 “Carne y productos Cárnicos. Productos Cárnicos, Productos Cárnicos Curados-Madurados Y Productos Cárnicos Precocidos-Cocidos. Requisitos”
- Norma NTE INEN 1 344:96 “Carne y Productos Cárnicos. Chorizo. Requisitos”

Tabla 1: Requisitos microbiológicos para productos cárnicos curados - madurados

REQUISITOS	n	c	m	M	MÉTODO DE ENSAYO
<i>Staphylococcus aureus</i> ufc/g *	5	1	1,0x10 ²	1,0x10 ³	NTE INEN 1529-14
<i>Clostridium perfringens</i> ufc/g *	5	1	1,0x10 ³	1,0x10 ⁴	NTE INEN 1529-18
<i>Salmonella</i> ufc/25g **	10	0	ausencia	-	NTE INEN 1529-15
* Requisitos para determinar tiempo de vida útil					
** Requisitos para determinar inocuidad del producto					

Fuente: Norma NTE INEN 1 338:2010

En la **Constitución Política de la República del Ecuador (RO 1:11 – agosto -1998)**, se ha investigado las siguientes leyes establecidas en la política ecuatoriana como sustentos legales que sirvieron de soporte fundamental para el desarrollo de éste trabajo de investigación.

TÍTULO II. DERECHOS.

CAPÍTULO SEGUNDO. Derechos del buen vivir

Sección primera. Agua y alimentación

Art 13.- Las personas y colectividades tienen el derecho al acceso seguro y permanente a alimentos sanos, suficientes y nutritivos; preferentemente producidos a nivel local y en correspondencia con sus diversas identidades y tradiciones culturales. El estado ecuatoriano promoverá la soberanía alimentaria.

TÍTULO V. DE LOS ALIMENTOS.

CAPÍTULO PRIMERO, De las características de los alimentos.

Art 130. Los alimentos que se ofrezcan al público deberán ser aptos para el consumo humano y cumplir con lo dispuesto en las leyes, reglamentos y normas técnicas vigentes.

TÍTULO VI. RÉGIMEN DE DESARROLLO.

CAPÍTULO TERCERO. Soberanía alimentaria

Art 281. La soberanía alimentaria constituye un objetivo estratégico y una obligación del Estado para garantizar que las personas, comunidades, pueblos y nacionalidades alcancen la autosuficiencia de alimentos sanos, y culturalmente apropiados de forma permanente.

Impulsar la producción, transformación agroalimentaria y pesquera de las pequeñas y medianas unidades de producción, comunitarias y de la economía social y solidaria.

Precautelar que los animales destinados para la alimentación humana estén sanos y sean criados en un entorno saludable.

Asegurar el desarrollo de la investigación científica y de la innovación tecnológica apropiadas para garantizar la soberanía alimentaria.

Prevenir y proteger a la población del consumo de alimentos contaminados o que pongan en riesgo su salud o que la ciencia tenga incertidumbre en sus efectos.

2.2.4. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES

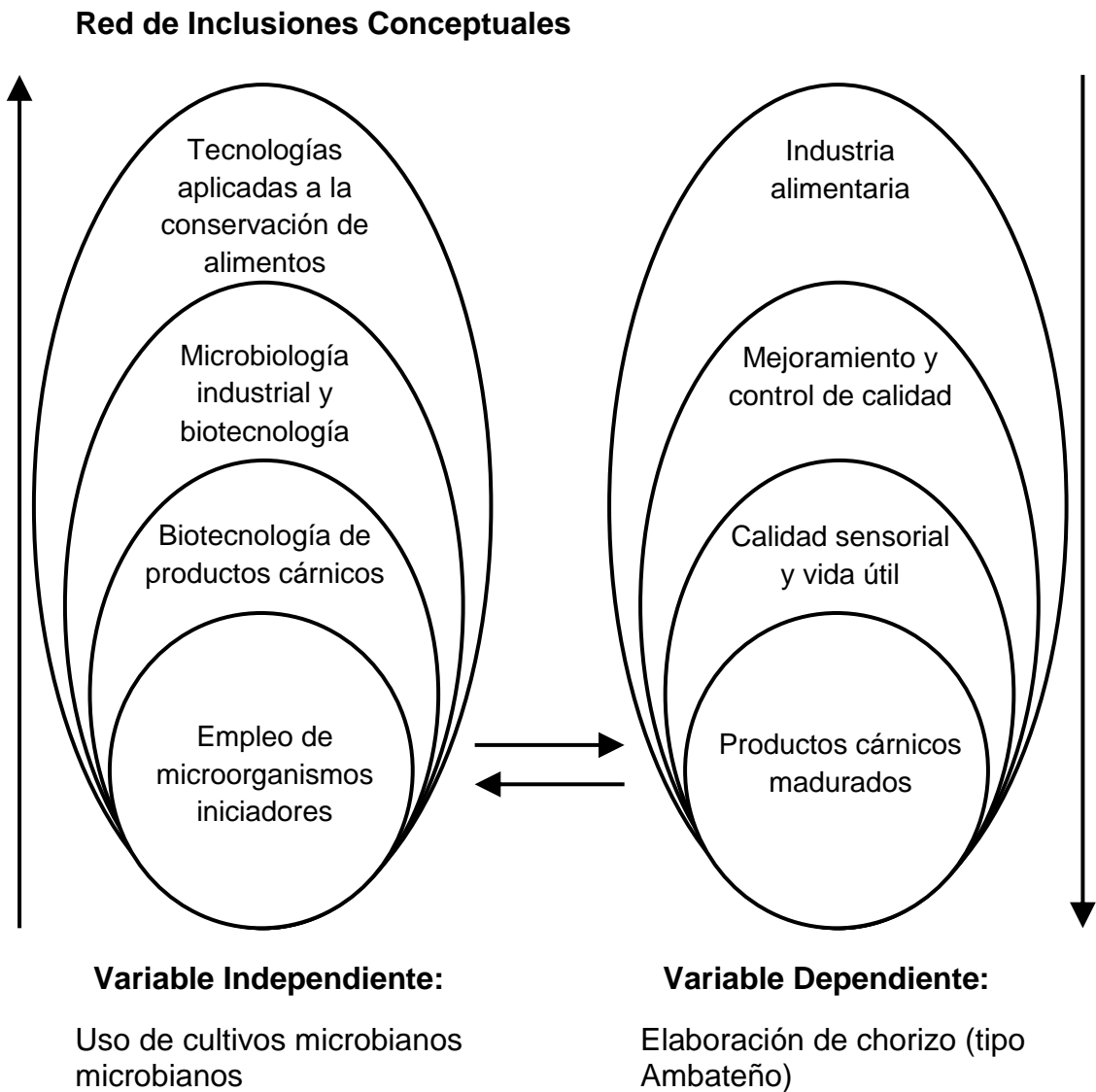


Gráfico 2. Red de inclusiones conceptuales

Elaborado por: Lenin D. Sarabia, 2011

2.4.1. Diagrama de flujo para la elaboración de chorizo (tipo Ambateño) madurado

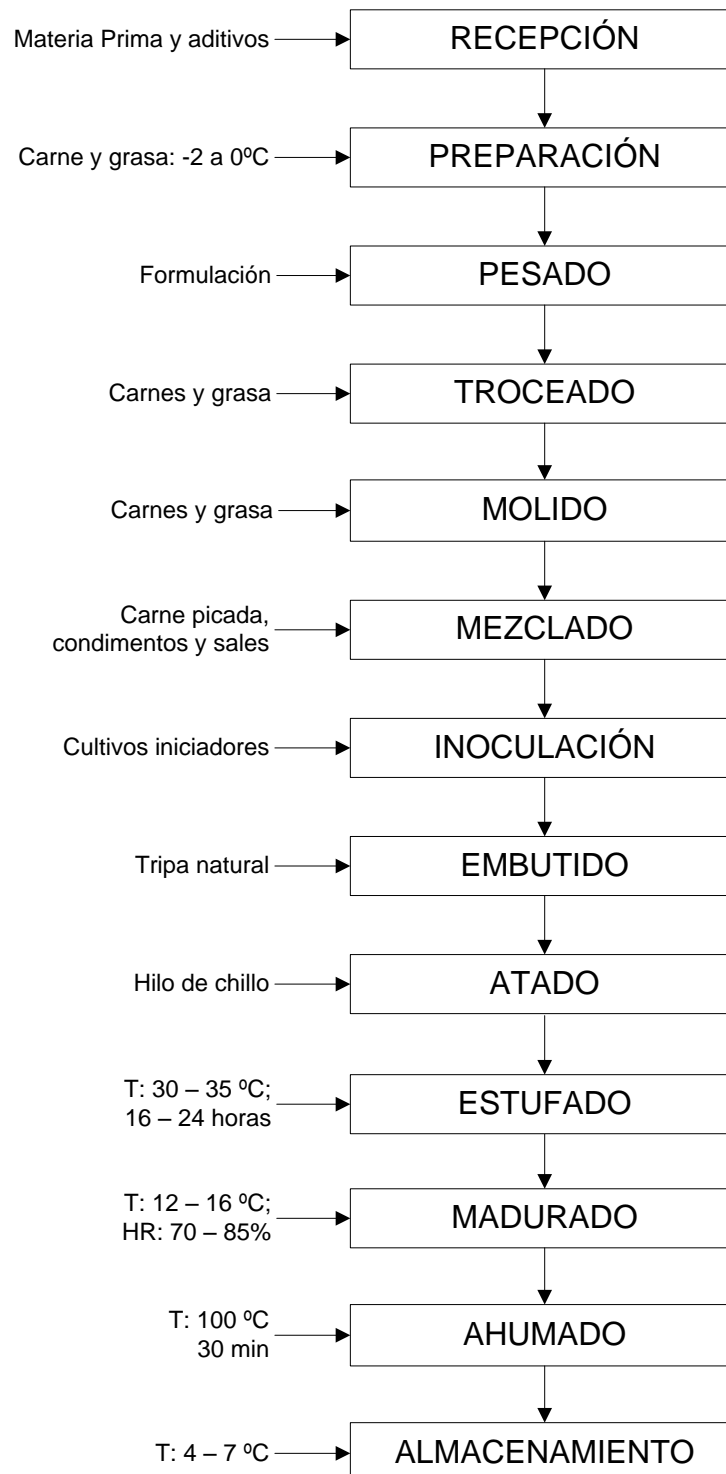


Gráfico 3. Diagrama de flujo para la elaboración de chorizo (tipo Ambateño) madurado.

Adaptado por: Lenin D. Sarabia; 2011

Fuente: Módulo de tecnología de cárnicos, Salazar D., 2009

2.4.2. PROCESO DE ELABORACIÓN DE CHORIZO (TIPO AMBATEÑO) MADURADO

COMPONENTES DEL CHORIZO

Carne.- se trata fundamentalmente de magros de vacuno y de cerdo. La masa inicial usada para la elaboración de chorizo contiene un 50 – 70% de carne magra.

Grasa.- se utiliza casi siempre grasas de estructura compacta y de aspecto firme: tocino, grasa de cobertura del jamón o de la paleta; la grasa puede llegar a representar hasta el 50% del producto después del secado.

Sal.- Se añade habitualmente a la mezcla en una concentración del 2,5 – 3%, lo que disminuye la actividad de agua inicial aproximadamente a 0,96.

Nitritos.- Se trata de un aditivo denominado “de salazón” cuyo papel bacteriostático es fundamental, al igual el de ayudar a mantener el color, mediante el curado, característico en productos cárnicos. Las dosis de uso habitual son de 150 ppm de la mezcla.

Cultivos iniciadores.- Los cultivos iniciadores principalmente están constituidos por bacterias ácido lácticas, y se añaden para mejorar la consistencia y el control de la fermentación. Se suministran en forma liofilizada y requieren reconstituirse antes de la adición.

Azúcares.- Los más utilizados son la dextrosa, sacarosa, lactosa y jarabes de glucosa. Estos sustratos permiten obtener una acidificación más o menos rápida e intensa del producto.

Especias y aromatizantes.- Son extractos provenientes de ciertas plantas o partes de ellas, o bien sus esencias; contienen sustancias aromáticas y por ello se emplean para aderezar y mejorar el aroma y sabor de los embutidos. Se puede utilizar: nuez moscada, cilantro, pimienta, plantas o bulbos usados como condimentos (ajo, cebolla).

Tripas.- Se llama tripa a un envoltorio cilíndrico que permite dar forma y protección a ciertos productos de charcutería crudos, cocidos, o que hayan sufrido un secado – maduración.

- **Tripas naturales:** Son obtenidas a partir del tubo digestivo de los porcinos, ovinos y equinos, sin ninguna transformación. Se utilizan para la elaboración de morcillas, salchichas.
- **Tripas artificiales:** Elaboradas a partir de fibra animal y constituidas por fibras de colágeno obtenidas por tratamiento térmico fisicoquímico de la dermis de los bovinos.
- **Tripas sintéticas:** Elaboradas a partir de sustancias celulósicas o de polímeros de síntesis. (Frey, 1983).

ELABORACIÓN DE CHORIZO (TIPO AMBATEÑO) MADURADO

Recepción de la materia prima y aditivos.- Las carnes empleadas deben provenir de mataderos autorizados. No se utilizan carnes con daños físicos o con evidente proceso de descomposición. Con el empleo de cuchillos se eliminan grasas blandas de la carne y nervios.

La grasa a utilizarse no debe ser blanda, para evitar que se derrita, por lo cual es importante seleccionar grasas duras. A ser posible se debe utilizar para la producción de embutido crudo de consistencia firme únicamente tocino fresco de lomo que se haya extraído inmediatamente después del sacrificio y refrigerado sin pérdida de tiempo.

Las especias deben ser frescas, sanas (libres de parásitos) y puras. Deben estar exentas de sustancias extrañas y de partes de la planta de origen que no posean las cualidades aromatizantes y de sabor (por ej. tallos). La sal deberá ser limpia y fina, y de consumo humano.

Tanto las tripas naturales como las artificiales hay que ponerlas a remojo antes de su utilización. De esta forma se hincha el colágeno y se abren los poros y además mejoran la suavidad y elasticidad de las tripas, lo que facilita los trabajos de embutición.

Preparación de la carne y grasa.- Se congela la carne magra y tocino por un lapso mínimo de 12 horas previo al proceso de elaboración, empleando un congelador. La carne deberá alcanzar los -18 °C en su interior. Es de suma importancia mantener baja la temperatura de proceso para prevenir el derretimiento de la grasa, así como la alteración de las proteínas cárnicas, necesarias para la formación de la masa.

Troceado y molido.- La carne manualmente es troceada en fragmentos de 5 a 10 cm, para su posterior molienda. La carne debe estar a una temperatura <5°C durante el picado, mientras que la grasa puede estar congelada. Primero se incorpora la carne de vacuno, luego la de cerdo, hasta alcanzar el tamaño de grano deseado. Posteriormente se añade el tocino congelado. Solamente a estas temperaturas podrá conseguirse un embutido de la consistencia deseada.

Adición de condimentos y aditivos.- Una vez picada la carne se incorporan los aditivos y condimentos, excepto la sal. Existen ciertos aditivos, como el nitrito, que es aconsejable mezclar con la sal para incorporarlos a la masa.

Adición de sal.- La adición de sal se realiza lo más tarde posible para evitar problemas con las proteínas de la carne que pueden afectar la calidad de la masa.

Inoculación.- Una vez lista la masa se agrega los microorganismos que serán responsables del mejoramiento de las propiedades organolépticas durante el proceso de maduración y secado.

Embutido.- En ésta etapa se debe eliminar el aire que pueda quedar dentro de la masa antes de embutir. Se puede pinchar la masa repetidas veces para que salga todo el aire interior. Además, alimentando la embutidora con bolas de masa, también permite eliminar el aire ocluido.

Atado de la tripa y colgado de los embutidos.- Se realiza principalmente para impedir la disminución de la presión de relleno. Se

realiza con la cuerda larga (hilo chillo) o con la ayuda de dispositivos especiales (clipeadora).

Estufado.- Una vez embutida la pasta, el chorizo es sometido a un alza de temperatura de 35 – 37 °C, óptima para el desarrollo de los microorganismos de los cultivos iniciadores empleados, por un tiempo de 16 y 24 horas. El objetivo es que durante éste tiempo la curación sea rápida y mayor

Maduración.- La cámara o sala de maduración debe tener una temperatura de 12 a 16 °C y una humedad relativa de 70 a 85%. Es en éstas condiciones donde el producto adquiere todas las características organolépticas que lo distinguen y lo transforman en un producto de alta calidad y gran aceptabilidad.

Almacenamiento.- Después del proceso de maduración, los embutidos se almacenan en un ambiente limpio a temperaturas de refrigeración de 4 a 7 °C a una humedad relativa de 70 a 85%. (Juárez, 2005).

2.4.3. PRODUCTOS CÁRNICOS MADURADOS

Los embutidos crudos curados son productos que se elaboran con carne y grasa animal picadas a las que se añaden sales, especias y aditivos autorizados; los cuales son mezclados y embutidos en tripas naturales o artificiales, y sometidos a un proceso de desecación durante el cual tiene lugar una fermentación microbiana que origina la acidificación del producto.

Estos productos se caracterizan porque se consumen crudos, se conservan sin necesidad de refrigeración y tienen un tiempo de vida útil muy largo. Además poseen características organolépticas muy apreciables, destacando su color rojo, consistencia, aroma y sabor típicos. No obstante, la elaboración de embutidos fermentados varía sustancialmente de unos países a otros e incluso existen diferencias entre regiones dentro del mismo país. Esto se debe básicamente a variaciones en la composición de los embutidos y a la tecnología de elaboración. Según Leistner (1986), la producción de embutidos fermentados crudos curados involucra una

tecnología imprecisa que permite grandes variaciones siempre que se mantenga el concepto básico de proporcionar una adecuada reducción del pH y/o de la actividad de agua (a_w), además afirma que deben cometerse graves errores en la fabricación para que se obtengan productos defectuosos.

Desde un punto de vista tecnológico, la denominación de embutido seco o curado engloba un determinado grupo de embutidos conocidos desde mucho tiempo atrás. La gran variedad que presentan se debe a los diferentes procesos de elaboración, entre los que cabe destacar dos avances tecnológicos:

- El desarrollo de la técnica de climatización que posibilita un control de la temperatura, humedad relativa y velocidad del aire durante la elaboración del embutido en cualquier época del año.
- La utilización de diversas sustancias o aditivos químicos y microbianos para la elaboración de embutidos (colorantes, aromatizantes y saborizantes, reguladores del potencial redox, cultivos iniciadores, etc.) que favorecen la aplicación de técnicas rápidas de fabricación.

A lo largo de los años los embutidos se han clasificado de diferentes maneras y las clasificaciones oficiales varían de unos países a otros. Las clasificaciones pueden basarse en diferentes propiedades, como el contenido en humedad, contenido en proteína, cociente humedad/proteína, etc. (Juárez, 2005).

Kinsman (1980) clasifica los embutidos en seis categorías:

- ✓ **Embutidos frescos.**- Elaborados a partir de carne picada condimentada y usualmente embutida en tripa natural. No están curados ni ahumados. Se deben someter a un tratamiento culinario antes de su consumo.
- ✓ **Embutidos cocidos.**- Fabricados a partir de carne picada, condimentada, curada y embutida en tripa. Están cocidos pero no ahumados.

- ✓ **Embutidos cocidos y ahumados.**- Obtenidos como los anteriores pero sometidos a un proceso de ahumado sin ningún tipo de tratamiento térmico.
- ✓ **Embutidos secos o semi-secos.**- Están elaborados con carne picada, condimentada y embutida en tripa. Se someten a un proceso de secado al aire bajo condiciones controladas de tiempo-temperatura-humedad. Pueden estar ahumados.
- ✓ **Especialidades cárnicas.**- Comprenden una gran variedad de productos que tiene en común el hecho de estar preparados a partir de carne curada o no, picada o triturada, condimentada y normalmente cocidos más que ahumados.

Por otro lado, Lücke (1985) propone la clasificación que se muestra en la Tabla 5 y define cuatro tipos de embutidos en función del porcentaje de pérdidas de peso que sufre el producto durante la maduración, asimismo afirma que los avances en las técnicas de procesado de la carne y de refrigeración están favoreciendo que aparezcan nuevos tipos de embutidos fermentados.

La clasificación de embutidos propuesta por Roca e Incze (1990), Tabla 6, considera el tiempo de fermentación y maduración como un criterio básico, y establece dos tipos dentro de los embutidos crudos curados: de maduración corta con un contenido final de agua en torno al 30-40 % y de maduración larga, con un contenido final de agua del 20-30 %.

Tabla 2: Clasificación de embutidos fermentados.

Tipo de producto	Pérdida de peso durante la desecación*	Ahumado	Crecimiento de mohos y levaduras
Embutido seco	>30%	no**	si
Ahumado	>20%	si	no
Embutido semi-seco	<20%	si	no
Embutido fermentado untable no desecado	<10%	si	No

Fuente: Microbiology of fermented sausages (Lücke, 1985)

* Aproximadamente

** O sólo ligeramente ahumado durante la fermentación

Tabla 3: Clasificación de embutidos fermentados (según Roca e Incze, 1990)

Tipo de embutido	Tiempo de Producción	Contenido de agua (%)	Valor a_w final
Untable	3 – 5 días	34 – 42	0,95 – 0,96
Lonchable:			
Maduración corta	1 – 4 semanas	30 – 40	0,92 – 0,94
Maduración larga	12 – 14 semanas	20 – 30	0,85 – 0,86

Fuente: Fermented sausages, Roca e Incze (1990)

En la clasificación que propone Adams (1986) los embutidos se dividen en dos categorías: secos y semisecos o de nueva generación en función de las pérdidas de peso ocurridas durante la maduración. Posteriormente Zeuthen (1995) propuso un sistema de clasificación (Tabla 7), también basado en la pérdida de agua del producto pero además introduce un nuevo criterio: la proporción agua/proteína; que es un término más exacto puesto que relaciona la pérdida de agua con el contenido proteico (muy variable en este tipo de productos).

Tabla 4: Tipos de embutidos fermentados (modificado por Zeuthen, 1995 de Adams, 1986).

Tipo	Pérdida de peso (%)	Contenido de agua (%)	Relación agua/proteína
Seco	25-50	25-45	2,3:1
Semiseco			
Medio	30	50	2,3-3,7:1
Nueva generación	20		
No desecados (untables)	10		

Fuente: Food preservation techniques (Zeuthen, 1995)

2.4.4. CULTIVOS INICIADORES UTILIZADOS EN LA INDUSTRIA CÁRNICA

La utilización de cultivos iniciadores en la industria cárnica está ampliamente difundida. Como se ha definido previamente, son microorganismos que se añaden a la carne con el fin de controlar

adecuadamente el proceso de fermentación y maduración de los embutidos crudos curados de forma que se consiga estandarizar el proceso y la calidad de los productos elaborados. Los microorganismos añadidos se instauran como flora predominante dirigiendo la fermentación y excluyendo a la flora indeseable, así se reducen los riesgos higiénicos y de fabricación por deficiencias de origen microbiano.

En la elaboración tradicional se confía en una “fermentación natural” en la cual las condiciones predominantes en el embutido favorecen el crecimiento selectivo de la flora microbiana adaptada que generalmente está compuesta por bacterias ácido lácticas y micrococos. Una forma de asegurar que esta flora beneficiosa esté presente consiste en inocular una porción de carne fermentada previamente a la masa fresca, con lo cual se consiguen productos de mayor consistencia y estabilidad. Esta práctica había sido utilizada durante muchos años con éxito; pero en 1940, Jensen y Padock investigaron la posibilidad de utilizar una cepa de *Lactobacillus* en la elaboración de embutidos crudos curados.

Esta experiencia despertó el interés de otros investigadores que iniciaron un estudio más profundo sobre los cultivos iniciadores y su aplicación a la industria cárnica. Se establecieron dos líneas de investigación: de un lado científicos norteamericanos (Niven *et al.*, 1954; Deibel, 1956) recomendaron especialmente el empleo de *Pediococcus cerevisiae* para la elaboración de embutidos crudos curados. Por otro lado, científicos europeos (Niinivaara, 1955; Pohja, 1960) estudiaron la utilización de cepas de micrococos estableciendo las ventajas tecnológicas que conllevaba su uso. Posteriormente Nurmi (1966) combinó ambos tipos de microorganismos, bacterias ácido lácticas y micrococos, en cultivos mixtos, obteniendo resultados más satisfactorios que cuando se empleaban independientemente.

El primer cultivo iniciador que apareció en el mercado, con aplicación en la industria cárnica, fue una cepa de *Pediococcus cerevisiae* (Niven *et al.*, 1959) que comercializó la firma Merck en Estados Unidos en 1957 para la elaboración de embutidos de verano y embutidos untables. Casi

paralelamente, en Alemania en 1961 se comercializó una cepa de *Micrococcus M53* (Niinivara *et al.*, 1964) suministrada por la compañía Rudolf Müller y en 1966 aparece por primera vez un cultivo iniciador que combina *Lactobacillus plantarum* con una cepa de micrococos (Nurmi, 1966). Las diferencias entre las cepas seleccionadas en Europa y Norteamérica se basan en los distintos gustos de sus consumidores. En USA el fabricante apuesta por procesos de acidificación más rápidos, con temperaturas de maduración de 38-40° C, que originan productos de sabor más ácido que es lo que prefieren los consumidores, en cambio en Europa se apuesta por los productos de maduración más lenta, con temperaturas bajas en torno a los 20° C, que permiten el desarrollo máximo de las características sensoriales.

Sin embargo, el hecho de que puedan obtenerse embutidos crudos curados de excelente calidad sin la adición de cultivos iniciadores ha originado que su utilización en la industria cárnica no se haya desarrollado ampliamente hasta la década de los 80 (Jensen, 1995). Hoy día se consideran un componente más entre los ingredientes de los embutidos, existiendo en el mercado una amplia gama de estos productos que cubren las necesidades tecnológicas de los fabricantes.

Microorganismos que componen los cultivos iniciadores

Son numerosos los géneros microbianos utilizados en la composición de los cultivos iniciadores. Aunque los más empleados pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas y las micrococáceas, se ha propuesto la utilización de otros géneros bacterianos como *Escherichia*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Corynebacterium* (Pätäja, 1977). También se utilizan determinadas especies de levaduras y mohos como flora de superficie, aunque la finalidad en este caso es fundamentalmente de aromatización y mejora de la apariencia externa. Las especies más utilizadas como componentes de cultivos iniciadores se recogen en la Tabla 5.

Tabla 5: Microorganismos usados como cultivos iniciadores para embutidos crudos curados (Hammes *et al.*, 1990).

Grupo microbiano	Especies usadas como iniciadores
Bacterias ácido lácticas	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus pentosus</i> , <i>Lactobacillus sake</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i>
Micrococáceas	<i>Staphylococcus carnosus</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i> <i>Micrococcus varians</i>
Levaduras	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Candida famata</i>
Mohos	<i>Penicillium nalgiovensis</i> , <i>Penicillium crysogenum</i>

Fuente: Applied microbiology and biotechnology (Hammes, 19990)

Los cultivos iniciadores comerciales deben cumplir una serie de requisitos que son indispensables para que su aplicación genere los beneficios esperados. Estos requisitos se pueden agrupar en tres principios básicos: seguridad, competitividad tecnológica y viabilidad económica. En lo relativo a la seguridad, los microorganismos utilizados como iniciadores no deben poseer actividad tóxica ni patógena y las preparaciones deben elaborarse con la máxima higiene y estar libres de cualquier tipo de contaminante, biológico o químico. Con respecto a las funciones tecnológicas, los microorganismos inoculados deben predominar sobre la flora espontánea de la masa cárnica y desarrollar su actividad metabólica. Finalmente, en cuanto a los aspectos económicos, el empleo del cultivo iniciador debe ser viable económicamente y su manipulación fácil; además el almacenamiento de los preparados en congelación o liofilización no debe afectar a las propiedades de la cepa ni ocasionar pérdidas de su actividad (Buckenhüskes, 1993).

Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las bacterias del ácido láctico (BAL) son el grupo bacteriano de mayor importancia en el proceso de elaboración de los embutidos fermentados. Estos microorganismos, especialmente el género *Lactobacillus*, son los responsables de la producción de ácido láctico durante la fermentación, provocando así una disminución del pH. Las BAL se desarrollan rápidamente

durante el proceso fermentativo y evolucionan desde 10^3 - 10^4 ufc/g hasta 10^8 - 10^9 ufc/g al final de la fermentación, manteniéndose en estos niveles al final de la maduración (Hugas *et al.*, 1993).

Los pediococos no suelen encontrarse como parte de la flora natural de los embutidos crudos pero su elevada resistencia al proceso de liofilización les ha convertido en uno de los géneros más utilizados en el mercado norteamericano (Hammes *et al.*, 1990).

Taxonomía

Las BAL forman un grupo natural de bacterias gram-positivas, anaerobias aerotolerantes, normalmente no móviles, no formadoras de esporas, catalasa negativas (algunas cepas presentan una pseudo-catalasa), con morfología de coco, coco-bacilo o bacilo, que fermentan carbohidratos para formar principalmente ácido láctico, con un contenido en G+C inferior a 55 mol%, pertenecientes, por tanto, a la subdivisión *Clostridium* de las eubacterias gram-positivas.

Aunque taxonómicamente forman un grupo bastante heterogéneo, los géneros incluidos son *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Pediococcus* y *Tetragenococcus* (Vandamme *et al.*, 1996).

Importancia de las BAL en la elaboración de embutidos

La principal función tecnológica de las bacterias lácticas en los embutidos crudos curados se basa en su capacidad para producir ácido a partir de los carbohidratos añadidos a la masa. Los microorganismos utilizados como iniciadores son preferiblemente homofermentativos y descomponen los azúcares por la ruta de Embden-Meyerhof obteniendo ácido láctico como único producto final (Kandler, 1983; Lücke y Hechelmann, 1987). Este ácido se acumula en el medio y como consecuencia origina una serie de efectos beneficiosos sobre el color, la textura y la conservación del embutido. Algunos autores (Hammes *et al.*, 1990) atribuyen cierta actividad nitrato y nitrito reductasa a determinadas especies de bacterias lácticas que también

contribuiría en el proceso de enrojecimiento. Se ha demostrado que *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus pentosus* poseen enzimas nitrato y nitrito reductasa, mientras que *Pediococcus pentosaceus* sólo presenta actividad nitrito reductasa; otras especies como *Lactobacillus curvatus* y *Lactobacillus sake* carecen de ella o es muy escasa (Wolf y Hammes, 1988). Por otro lado, el pH ácido ejerce un potente efecto inhibitor del crecimiento de los microorganismos indeseables contribuyendo así a la conservación del embutido. No obstante, esta acción inhibitora no se puede explicar basándose únicamente en el factor pH, sino que probablemente se debe a la interacción de otros factores como la presencia de ácidos orgánicos, la presencia de peróxido de hidrógeno y la producción de bacteriocinas.

Algunas BAL (principalmente lactobacilos y enterococos) tienen la capacidad de sintetizar bacteriocinas, sustancias con actividad antibacteriana de naturaleza proteica y por tanto biodegradables, que pueden inhibir el crecimiento de algunos patógenos y otras bacterias estrechamente relacionadas filogenéticamente con las bacterias productoras. Así por ejemplo, se ha demostrado que la bacteriocina sakacina K producida por *Lactobacillus sakei* CTC494 es capaz de inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en salchichón (Hugas *et al.*, 1995).

Por otro lado, la aptitud de una cepa para ser un buen cultivo iniciador depende del tipo de producto que se desea fabricar y de las condiciones del procesado. Los preparados comerciales suelen incluir alguna de las siguientes especies: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus curvatus*, *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus pentosaceus*. Para que puedan desarrollar su función tecnológica deben estar presentes en la masa cárnica en un número superior a 10^6 ufc/g.

Los principales criterios que se siguen para la selección de la cepa iniciadora más adecuada dependen en gran parte del tipo de embutido que se va a fabricar y de los atributos que se desea obtener en el producto final. Una cualidad deseable es que la producción de ácido sea rápida al comienzo de la fermentación para inhibir el desarrollo de microorganismos indeseables, sin embargo, si la formación de ácido es excesiva puede dar

lugar a defectos en el color y a la presencia de gas en el embutido. La utilización de cepas con índice de producción de ácido muy incrementado sólo está indicado en casos muy concretos (Buckenhüskes, 1993).

La cepa seleccionada debe ser capaz de crecer a diferentes temperaturas y predominar durante todo el proceso de maduración. Es conveniente que establezca interacciones sinérgicas con otras bacterias componentes del cultivo iniciador, en cambio, debe presentar una acción antagónica hacia los microorganismos tecnológicamente indeseables y los patógenos. En este sentido, es importante seleccionar cepas que tengan capacidad para sintetizar bacteriocinas, ya que aunque su actuación esté limitada, pueden participar como un elemento secundario de inhibición junto a otros factores como el pH, la reducción de la a_w o la competencia por los nutrientes (Huisin't Veld, 1996).

Finalmente, otro aspecto tecnológico a tener en cuenta en la elección de la cepa es su posible participación en la formación del aroma. Distintos autores han defendido la actividad lipolítica y proteolítica que pueden desarrollar ciertas bacterias lácticas en los embutidos (Coretti, 1965; Reuter, 1975, El Soda *et al.*, 1986; Papon y Talon, 1988; Nielsen y Kemner, 1989) aunque existe gran controversia en torno a este tema.

Cocos gram-positivos catalasa-positivos (CGC+)

Simultáneamente al crecimiento de las BAL, se produce el desarrollo de otro grupo microbiano de gran importancia en los embutidos: los cocos gram-positivos, catalasa-positivos (CGC+). Este grupo incluye micrococos y estafilococos coagulasa negativos (ECN), siendo éstos últimos los más abundantes ya que crecen mejor en anaerobiosis. Los recuentos de este grupo de microorganismos en los embutidos fermentados parten de una situación inicial de $10^2 - 10^4$ ufc/g has alcanzar niveles que oscilan entre 10^5 y 10^8 al final del proceso de fermentación.

Es en este grupo microbiano donde reside la base de la peculiaridad que caracteriza a los embutidos fermentados de baja acidez. Según Montel *et al.* (1998), en los productos cárnicos fermentados de pH elevado especies de

Staphylococcus de elevada capacidad lipolítica podrían incrementar el grado de lipólisis en este tipo de embutidos. La acidificación parece ser un factor limitante en el desarrollo del aroma dado que a valores de pH inferiores a 5,0 las reacciones metabólicas bacterianas se ven desfavorecidas.

Taxonomía

Los CGC+ pertenecían a la familia tradicionalmente conocida como *Micrococcaceae*. Esta familia se consideraba dividida en 4 géneros: *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Stomatococcus* y *Planococcus*. Gracias al avance que han experimentado las técnicas taxonómicas moleculares en los últimos años, actualmente se considera que no existe tal familia, y las especies englobadas en el género *Micrococcus* se han reclasificado en 5 géneros (Stackebrandt *et al.*, 1995): *Kytococcus*, *Nesterenkonia*, *Dermacoccus*, *Kocuria* y *Micrococcus*.

Considerando estos antecedentes, parece más acertado denominar cocos gram-positivos catalasa-positivos al grupo que incluye bacterias gram-positivas, aerobias facultativas, catalasa-positivas y con actividad nitrato-reductasa; algunos de los CGC+, además, toleran concentraciones importantes de cloruro sódico. Del mismo modo que las BAL, aunque en menor proporción, pueden hidrolizar la glucosa produciendo gas y ácido.

Descripción del género *Kocuria* (Stackebrandt *et al.*, 1995)

El género *Kocuria* está formado por bacterias cocoides, gram-positivas, catalasa-positivas, no encapsuladas, que no forman endosporas. Son microorganismos quimioorganótrofos, de metabolismo estrictamente respiratorio. Aunque son bacterias aerobias, las cepas de una especie, *K. kristinae*, pueden ser anaerobias facultativas. No son halófilas, normalmente crecen en medios con un 10% de NaCl, si bien *K. varians* crece mejor con un 7,5% de NaCl. Mesófilas. Su contenido en G+C del ADN varía entre 66-75 mol%. La especie tipo es *K. rosea*. Las especies más descritas en embutidos fermentados son *K. varians* y *K. kristinae* (Fischer y Schleifer, 1980; Comi *et al.*, 1992).

Descripción del género *Staphylococcus*

El género *Staphylococcus* está compuesto por bacterias esféricas, de 0,5-1,5 μm de diámetro, gram-positivas, no móviles, no esporuladas, anaerobias facultativas. Son microorganismos quimioorganótrofos, presentan metabolismo respiratorio y fermentativo. Son catalasa-positivos y, normalmente, oxidasa negativos. Generalmente presentan actividad nitrato-reductasa. Son susceptibles a la lisis por lisostafina pero no por lisozima (Schleifer y Kloos, 1975). Normalmente crecen en medios con un 10% de NaCl (*S. carnosus* puede crecer con un 15% de NaCl). Su temperatura óptima de crecimiento está comprendida entre 30-37°C. El contenido en G+C del ADN varía entre 30-38 mol% (Stackebrandt *et al.*, 1995).

La especie de mayor prevalencia en embutidos fermentados es *S. xylosus* aunque también se han descrito otras especies como *S. carnosus*, *S. simulans*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri* y *S. equorum* (Fischer y Schleifer, 1980; Simonetti y Cantoni, 1983; Seager *et al.*, 1986; Coppola *et al.*, 1996; García-Varona *et al.*, 2000), todos ellos estafilococos coagulasa negativos (ECN).

Importancia de los CGC+ en la elaboración de embutidos

El papel que desempeñan estos microorganismos en los procesos fermentativos cárnicos se centra principalmente en tres aspectos:

Actividad catalasa

La catalasa es una enzima que forma parte de la estructura biomolecular de los CGC+. Su importancia radica en que descompone los peróxidos que se forman durante la hidrólisis de los carbohidratos en presencia de oxígeno por acción de las flavinoxidasas o las NADH peroxidasas de las BAL y, en menor medida de los CGC+ (Kandler, 1983). Los peróxidos inhiben el crecimiento de patógenos en el embutido, pero también son responsables de alteraciones del color por oxidación del pigmento, así como de las reacciones de enranciamiento lipídico que ocasionan defectos en las características organolépticas del producto final.

Actividad nitrato y nitrito reductasa

El nitrato se adiciona a la masa cárnica por su capacidad para fijar y conseguir el color típico de los productos curados más que por sus características antioxidantes y antimicrobianas. Para ser efectivo, el nitrato añadido debe ser reducido a nitrito. Los CGC+ utilizan el nitrato como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria. Este hecho provoca la reducción de nitrato a nitrito, que conjuntamente con un medio ácido, favorece la transformación del nitrito a óxido nitroso por medio de microorganismos presentes en el embutido (incluyendo microbiota nitrato-reductora y algunas cepas de bacterias lácticas) y éste se descompone originando óxido nítrico. El óxido nítrico formado reacciona con la mioglobina (pigmento muscular) de la carne para producir el deseado pigmento rojo típico de los productos curados: el nitrosopigmento o nitrosomioglobina (Palumbo y Smith, 1977).

Actividad proteolítica y lipolítica

La presencia de numerosas lipasas y proteasas favorece la liberación de ácidos grasos volátiles, sustancias aromáticas, ruptura de triglicéridos, formación de péptidos, aminoácidos y otros compuestos, incidiendo de forma notable en el aroma del producto. Estos efectos son más remarcables en el género *Staphylococcus*, ya que sus especies disponen de un mayor número de proteasas y lipasas que las del género *Kocuria*, pueden crecer en medios con una elevada concentración de NaCl y, lo que es más importante, pueden seguir realizando funciones lipolíticas y proteolíticas aún en ausencia de oxígeno (Comi *et al.*, 1992).

Además de las actividades descritas, los CGC+ también producen ácidos orgánicos dado que pueden metabolizar carbohidratos, provocando una disminución del pH, que contribuye a la fijación del nitrosopigmento y a la inhibición de microorganismos patógenos (Miralles *et al.*, 1996). La disminución del pH, sin embargo, no es tan acusada como en el caso de las BAL. Los dos grupos microbianos son importantes durante la fermentación de la carne y, de hecho, son las interacciones que se establecen entre las

actividades metabólicas de las BAL y los CGC+ las que determinan el desarrollo de las características típicas de los embutidos fermentados, tanto desde el punto de vista de su calidad sensorial, como en referencia a la estabilidad y la seguridad microbiológica. De forma esquemática, el Gráfico 3 muestra la complejidad de estas interacciones.

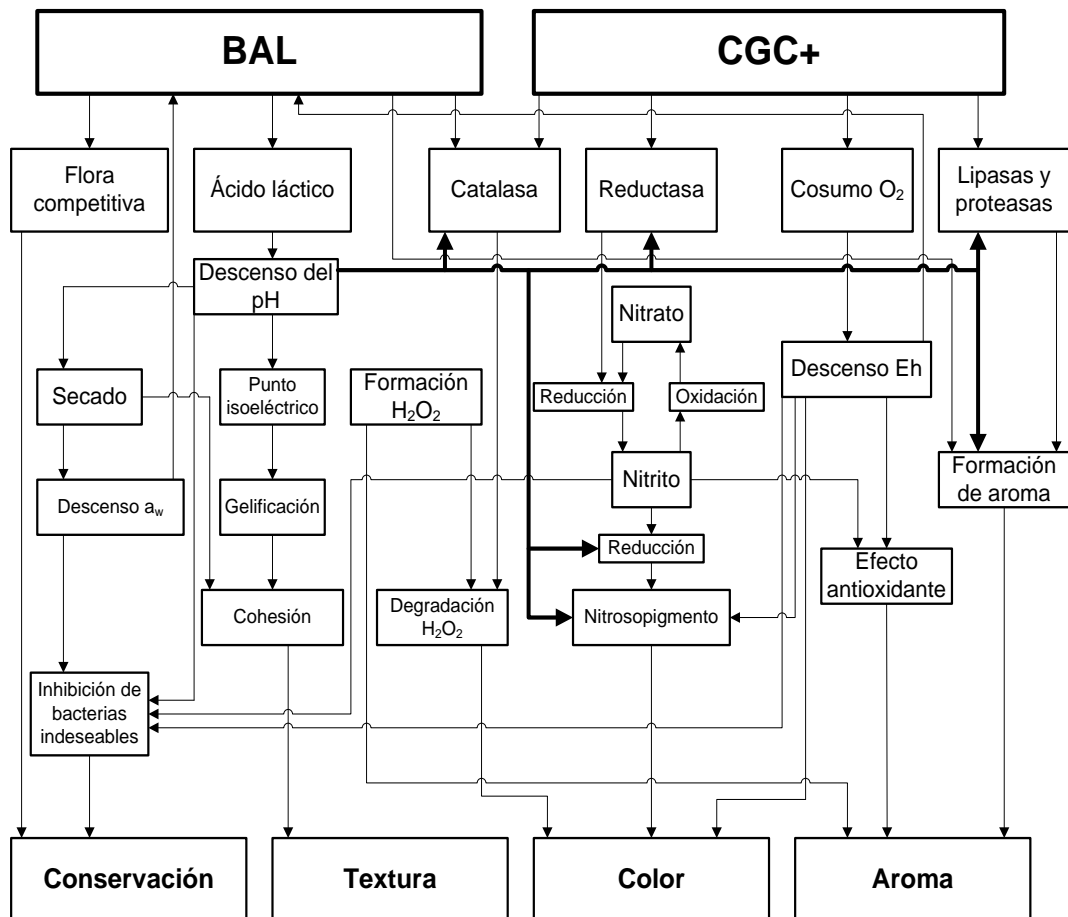


Gráfico 4. Interacciones entre BAL y CGC+ que se establecen durante la fermentación de los productos cárnicos (Buckenhüskes, 1993).

2.4.5. PROCESO DE ELABORACIÓN

La base de la amplia variedad de embutidos crudos curados fermentados que existen en el mercado radica en una tecnología de fabricación flexible que permite realizar muchas modificaciones siempre que se mantengan las reducciones adecuadas de pH y a_w (Leistner, 1992).

La obtención de un embutido fermentado de calidad requiere un proceso fermentativo en el que se produce un descenso del pH y una etapa de maduración en la que se desarrollan el aroma y textura típicos como consecuencia de los numerosos procesos químicos y enzimáticos que tienen lugar. También es imprescindible la subsiguiente fase de desecación, ya que en ella se produce una reducción de la a_w que en combinación con la disminución del pH hace que el embutido adquiera su capacidad de conservación, además de la consistencia adecuada (Frey, 1983).

Picado de la carne y la grasa

Los embutidos crudos curados fermentados pueden tener un grado diverso de picado (fino, medio o grueso). Si el picado es grueso, la carne y la grasa se desmenuzan en una máquina picadora, mientras que para conseguir un picado medio o fino se recurre a la *cutter*, sobre todo si las materias primas están congeladas (Girard *et al.*, 1991).

La operación de picado influye decisivamente en el trabado de la masa y en la adecuada consistencia al corte del producto final. Si la pasta se calienta demasiado por refrigeración insuficiente o por congelación deficiente de la materia prima, las partículas de grasa se disponen alrededor de la carne magra y el embutido conserva una consistencia excesivamente blanda debido a que las partículas de carne no se han trabado convenientemente. Asimismo, resulta muy perjudicada la cesión de agua al exterior durante la fase de desecación, ya que la grasa se distribuye en forma de película alrededor de todo el embutido (Roca e Incze, 1990).

Mezclado con el resto de ingredientes y aditivos

Además de la carne y la grasa, los embutidos fermentados contienen o pueden contener una serie de aditivos que cumplen diversas funciones durante el proceso de elaboración y que participan de las características del producto final.

Sal común

La adición de sal es esencial para la elaboración de embutidos crudos curados (Leistner, 1992). Además de ser un ingrediente que mejora el sabor, su importancia tecnológica radica en su influencia sobre múltiples reacciones de los procesos de maduración y desecación. Además, adicionando sal se reduce el valor de la a_w , con lo que se restringen las condiciones de desarrollo de algunos microorganismos indeseables. La sal ejerce un papel primordial en la ligazón de la pasta, ya que interviene en la solubilización de las proteínas cárnicas, permitiendo que formen una película adhesiva que propicia que las partículas de carne se intercalen entre las partículas de grasa (Varnan y Sutherland, 1998). La cantidad de sal adicionada depende del tipo de embutido y suele variar entre un 2 y un 3% en el producto final.

Nitratos y nitritos

El principal objetivo de la adición de nitratos y nitritos a los embutidos crudos curados es la inhibición de microorganismos indeseables como *Clostridium botulinum*, pero también contribuyen en la formación del color típico de los productos curados (por formación del complejo nitrosomioglobina), en el desarrollo del aroma a curado (por reacción de varios componentes de la carne con el nitrito o el óxido nítrico) y ejerce un efecto antioxidante (actuando contra los productos generados en los procesos oxidativos de los componentes lipídicos). Las cantidades legalmente autorizadas en Ecuador son de 150 ppm para los nitritos y 300 ppm para los nitratos. Además, las cantidades residuales de nitritos y nitratos en el producto final no deben superar las 50 y 250 ppm, respectivamente. (Juárez, 2005)

Glúcidos

El descenso de pH tiene lugar por acción de los microorganismos presentes en la masa del embutido crudo frente a los azúcares que metabolizan hasta ácidos (Roca e Incze, 1990). El descenso de pH puede ser más o menos pronunciado según el tipo y la cantidad de azúcar adicionado. La glucosa es asimilada rápidamente por casi todos los

microorganismos, pero también se utilizan lactosa, sacarosa u otros azúcares menos asimilables como el almidón o dextrinas para regular la velocidad de la acidificación (Lücke, 1998).

Ascorbato

Sustancia antioxidante y coadyuvante del proceso de curado que ayuda a disminuir la cantidad de nitrito residual puesto que favorece su transformación a óxido nítrico con lo que, además, mejora la formación y estabilización del color. Se permite la adición de ácido L-ascórbico o ascorbato sódico en dosis de hasta 150 ppm. (Juárez, 2005)

Espicias

Las especias son ingredientes vegetales con carácter aromático que se utilizan habitualmente en pequeñas cantidades para conferir determinados sabores, aromas y colores a los productos cárnicos. Además de sus propiedades aromáticas, debidas a los aceites esenciales y las oleorresinas que contienen, muchas especias son antioxidantes (como la pimienta negra y el jengibre) y antimicrobianas (por ejemplo el ajo). Las proporciones de utilización de especias en los embutidos fermentados son variables. Así, por ejemplo, el ajo y el pimentón se emplean a razón de 2-6 g/Kg y 0,5-25 g/Kg, respectivamente, en chorizos, sobrasada y lomo embuchado; La pimienta negra y blanca se adicionan en cantidades que oscilan entre 0,1 y 4 g/Kg en los salchichones (Rodríguez-Rebollo, 1998).

Cultivos iniciadores

Los microorganismos desempeñan un papel decisivo en la fabricación de embutidos fermentados, ya que están directamente implicados en la reducción de nitratos a nitritos, el descenso de pH, la formación del aroma, la estabilidad del color y la capacidad de conservación del producto. Sin embargo, no todos los microorganismos presentes en las materias primas contribuyen a la maduración prevista, y algunos de ellos pueden derivarla hacia una dirección indeseable. Para corregir posibles defectos en la maduración del producto en numerosas ocasiones se opta por utilizar

cultivos de microorganismos seleccionados que influyen de manera beneficiosa sobre la fermentación del embutido además de inhibir el desarrollo de la microbiota acompañante que normalmente llega a la masa del embutido procedente de la materia prima o en el transcurso de la fabricación (Frey, 1983).

Las especias, los aditivos, el azúcar y la sal suelen agregarse a la masa básica de carne y grasa picadas, la mezcla se homogeniza por acción de una máquina amasadora para obtener una distribución adecuada de todos los componentes. La a_w de la masa se ve reducida desde 0,99 hasta 0,96 por la presencia de la sal, los agentes de curado y los azúcares y el nitrato y/o nitrito ejercen su efecto inhibitor (Ordóñez *et al.*, 1999). En el caso que se añadan cultivos iniciadores, se hace al final del proceso, cuando el resto de ingredientes forman ya una masa uniforme. Tras su adición se continúa con el amasado para que la distribución de los microorganismos sea homogénea en toda la mezcla.

Embutido

Tras mezclar todos los ingredientes, la pasta debe introducirse en las tripas para constituir las piezas de embutido. En esta operación debe facilitarse la salida del aire del interior de la tripa y comprimir y conformar la pasta. Las tripas deben ser permeables al vapor de agua y pueden ser artificiales (fibrosas, de colágeno) o naturales. (Juárez, 2005)

Fermentación

Los embutidos se cuelgan a continuación en cámaras de aire acondicionado o natural, y se mantiene a una temperatura variable (entre 12-25°C) y 90-95% de humedad relativa durante un periodo de tiempo que puede variar entre 24 y 72 h. Durante esta etapa los microorganismos, presentes en la carne o bien adicionados como cultivos iniciadores, metabolizan los azúcares presentes y/o añadidos a la masa a ácido láctico principalmente y el pH disminuye hasta valores próximos a 5.0, es decir, alrededor del punto isoeléctrico de las proteínas cárnicas (Demeyer, 1992). Esto reduce la capacidad de retención de agua de la masa, facilitando el

secado posterior, además de promover la coagulación de las proteínas cárnicas, que aporta firmeza al producto final (Bacus, 1984).

Junto con la fermentación de azúcares, las proteínas musculares cárnicas (actina y miosina) empiezan a ser degradadas a péptidos, lo que se traduce en un aumento del nitrógeno no proteico. Las principales responsables de esta degradación son las proteasas musculares, fundamentalmente la catepsina D.

Al mismo tiempo, se inicia la hidrólisis lipídica o lipólisis, fenómeno que se debe tanto a la presencia de lipasas microbianas (Ordóñez *et al.*, 1999), como de lipasas endógenas de la carne, destacando la lipasa ácida liposomal (García *et al.*, 1992; Toldrà, 1992).

También durante esta fase los cocos gram-positivos catalasa-positivos realizan la reducción de los nitratos a nitritos dando lugar a la formación de la nitrosomioglobina.

Curado

Una vez finalizada la etapa de fermentación, los embutidos se sitúan en la cámara de curado, donde empieza el proceso de maduración y, simultáneamente, el secado del producto. Esta etapa implica el mantenimiento de los embutidos durante periodos variables de tiempo en condiciones de humedad y temperaturas controladas (Chang *et al.*, 1996). Los procedimientos más habituales suelen consistir en 5-10 días a 18-22°C y humedad relativa entre el 80 y el 90% y, posteriormente, se mantienen a 12-15°C y una humedad relativa del 65-80% (Toldrà, 1992).

La duración de este último periodo del curado es variable, en función de la clase de producto y su diámetro, pero suele oscilar entre unos 20 (curado rápido) y 90 (proceso tradicional) días (Flores, 1997). No obstante, todos estos parámetros pueden variar considerablemente de un embutido a otro, especialmente en los embutidos elaborados de forma artesanal.

La deshidratación es un requisito esencial para conseguir la firmeza final de la masa del embutido (Incze, 1992). Tras la fermentación, la masa

coagulada es todavía inestable y está debilitada por una capa intermedia de moléculas de agua. Para lograr la firmeza final de la masa las moléculas de agua inmobilizadas que ocupan los espacios entre los agregados de proteínas deben liberarse (Chang *et al.*, 1996). Esto se consigue realizando una deshidratación continua mediante el ajuste y control de las condiciones de secado de la cámara de curado.

Paralelamente a la deshidratación se producen los fenómenos asociados a la maduración del producto. La proteólisis, iniciada durante la fermentación, continúa ahora con la actuación de las exopeptidasas, tanto endógenas como de origen microbiano, que liberan pequeños péptidos y aminoácidos libre (Verplaetse, 1994; Molly *et al.*, 1997). La fracción de nitrógeno no proteico se enriquece, además, con el amoniaco procedente del metabolismo microbiano de los aminoácidos (Demeyer, 1992), provocando un ligero aumento del pH (Verplaetse *et al.*, 1989).

Este incremento en el nitrógeno no proteico y los aminoácidos libres contribuye, aparte de al sabor y aroma del producto final, a su desecación, pues acelera la pérdida de agua (DeMasi *et al.*, 1990).

La lipólisis, iniciada durante la fermentación, continúa en esta fase de maduración. Además, los ácidos grasos libres generados sufren diversas reacciones oxidativas que conducen a la aparición de sustancias volátiles y no volátiles que contribuyen al sabor y aroma del embutido (Demeyer *et al.*, 1986).

Por último, durante esta fase tiene lugar la completa reducción del nitrito residual de la fermentación, con lo que los valores finales suelen estar por debajo de los 10 mg/Kg de producto (Incze, 1992).

Envasado

Una vez secados, los embutidos se envasan en cajas de cartón o en bolsas de plástico (en algunos casos al vacío). En ocasiones se venden ya loncheados y envasados al vacío.

2.4.6. CAMBIOS EN LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE PRODUCTOS CÁRNICOS MADURADOS

pH

El pH es probablemente el parámetro más importante durante la fermentación de los embutidos crudos curados. La reducción del valor de pH supone una garantía en la higiene microbiana, además contribuye a la intensificación de la velocidad de desecación, facilitando la evaporación de agua en el rango próximo al punto isoeléctrico de las proteínas. Según Demeyer et al. (1979) el pH de los embutidos crudos curados está principalmente determinado por el lactato, el amonio y el contenido de agua que interacciona con las proteínas de la carne; estos factores explican el 75 % de las variaciones de pH. Al final de la maduración se observa un ligero incremento del pH debido a la formación de amonio, al incremento de sustancias con capacidad tampón y a la disminución de la disociación de los electrolitos presentes, durante este período no hay correlación entre la producción de ácido láctico y el pH (List y Klettner, 1978).

El descenso de pH, que se produce como consecuencia de la acidificación, origina una serie de cambios muy beneficiosos que afectan a las características microbiológicas y sensoriales del producto. Pero la obtención de un producto final de calidad depende de la velocidad e intensidad de la disminución del pH que, a su vez, depende de un gran número de factores; de los que se relacionan a continuación los más destacables (Liepe et al., 1990):

- Adición o no de cultivos iniciadores.
- Cantidad de azúcar.
- Tipo de azúcar, en relación con el tipo de cultivo iniciador añadido.
- Temperatura de las cámaras de maduración en la etapa inicial del proceso de desecación.

Como se ha mencionado anteriormente, el pH del medio afecta al crecimiento microbiano. Muchas bacterias crecen óptimamente a pH próximos a 7 y lo hacen poco a pH inferiores a 4 o superiores a 9. El pH de

la carne postmortem oscila entre 7 y 5,5, por lo que es evidente que el crecimiento microbiano en estas condiciones puede ser muy intenso. En las carnes curadas es deseable un pH ácido, ya que al incrementarse la concentración de nitrito que se encuentra en forma no disociada como ácido nitroso, la concentración de éste necesaria para controlar el crecimiento de determinadas especies patógenas se reduce considerablemente. Así por ejemplo, la cantidad de nitrito para inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* cuando el pH final es de 5,5 es veinte veces inferior de lo que requiere a pH 6,9 (Castellani y Niven, 1955).

Acidez titulable (g ácido láctico/100 g)

La acidificación se produce por la formación de ácido láctico a partir de los azúcares presentes en la masa cárnica. Esto provoca un descenso del pH que es más acusado en los primeros quince días de maduración, tras los cuales sufre pocos cambios (DeKetelaere *et al.*, 1974).

Los azúcares de bajo peso molecular (monosacáridos y disacáridos) son metabolizados antes y con mayor rapidez que los de peso molecular elevado (polisacáridos), estos últimos se acumulan formando una reserva azucarada. Los distintos azúcares son utilizados de manera diferente por la microflora de los embutidos, así la glucosa puede ser aprovechada por todos los lactobacilos, mientras que la sacarosa y maltosa sólo puede ser utilizada por el 80 % y 29 % de las cepas, respectivamente (Prändl *et al.*, 1994).

El catabolismo de los azúcares de la masa puede realizarse por una vía homofermentativa o heterofermentativa dependiendo de las especies microbianas fermentadoras y de las condiciones del cultivo, en determinadas condiciones de aerobiosis o anaerobiosis los microorganismos pueden tener un comportamiento diferente. Las bacterias lácticas de interés en la industria cárnica son heterofermentadoras facultativas, pueden seguir las dos vías pero, en general, en presencia de glucosa siguen la vía homofermentadora produciendo exclusivamente ácido láctico.

En la fermentación homoláctica, también denominada vía de la glucólisis o vía de Embden-Meyerhof; las bacterias lácticas descomponen la glucosa

en dos moléculas de ácido pirúvico, el cual es posteriormente convertido en lactato por la enzima lactato deshidrogenasa. En esta reacción por cada Gramo de azúcar se forma 1 Gramo de ácido láctico (Andersen y Ten Cate, 1965). Otra posibilidad es la vía de las pentosas fosfato o fermentación heteroláctica en la cual se obtienen como productos finales ácido láctico, ácido acético y etanol. También pueden producirse pequeñas cantidades de ácido propiónico y butírico dependiendo del azúcar metabolizado.

Pérdida de peso

Una de las características principales de los embutidos crudos curados es que son productos desecados. Durante la maduración se producen pérdidas de agua que conllevan a una reducción del peso (mermas) que puede oscilar entre un 20-40 % del peso inicial, pero además la desecación provoca una disminución de la a_w inicial (próxima a 0,96) que reduce la disponibilidad del agua del alimento.

La pérdida de humedad debe ser un proceso gradual, equilibrado con el proceso paralelo de maduración, que permita la difusión de las moléculas de agua desde las zonas más internas del embutido hasta el exterior. La a_w de las carnes fermentadas varía dependiendo del grado de picado de la carne, del tiempo de maduración, del contenido de sal y azúcar, de la permeabilidad de la tripa y de la temperatura y humedad relativa del aire. Es importante que exista un gradiente de humedad entre el interior del embutido y el aire circundante, pero cuando este gradiente es muy acusado se produce un secado muy intenso en la porción cortical que da lugar a la formación de una capa reseca, impermeable a la humedad, que impide la expulsión del agua del interior y por tanto no disminuye la a_w . En estas condiciones se ve favorecido el crecimiento de microorganismos indeseables y, como consecuencia, se pueden producir defectos de consistencia, alteración del enrojecimiento, aparición de huecos, agrietado y presencia de olores y sabores desagradables. (Frey, 1995).

Leistner y Wirth (1972) afirman que el rango de a_w para embutidos fermentados oscila entre 0,83 y 0,96 con una media de 0,91. En estos

rangos de a_w se pueden considerar estos productos como alimentos de humedad intermedia (AHI) que incluye a todos aquellos que se encuentran entre el intervalo de 0,60 y 0,90 de a_w . Los AHI se caracterizan por ser productos con un contenido acuoso intermedio entre los frescos y los deshidratados, que no necesitan rehidratación para ser consumidos y que son estables a temperatura ambiente (no precisan refrigeración).

La carne fresca tiene una a_w próxima a 0,99 pero cuando va a utilizarse para la producción de embutidos crudos curados debe disminuirse hasta 0,96-0,97. Tecnológicamente esto se logra mediante la adición de cloruro sódico, nitrito y azúcares, también el empleo del 25-30 % de grasa reduce la a_w de la mezcla inicial. Con esta disminución de la a_w se previene el crecimiento de muchos microorganismos lo cual favorece el desarrollo de la flora láctica, micrococos y estafilococos no patógenos. Posteriormente el proceso de desecación-maduración provoca la pérdida de parte de agua y permitirá llegar a los rangos de a_w finales (0,784-0,894).

En general, los microorganismos responsables de las toxiinfecciones alimentarias son incapaces de crecer cuando la a_w es inferior a 0,91, a excepción del *Staphylococcus aureus* en aerobiosis, que puede desarrollarse incluso a a_w de 0,860. También determinadas especies de levaduras y mohos pueden crecer a a_w inferiores a 0,75.

Consistencia (rebanabilidad)

En los productos curados la consistencia está relacionada con la formación de una matriz cuyas propiedades dependen casi exclusivamente de las proteínas de la carne empleada como materia prima. En 1958, Kotter y Prändl describieron por primera vez los procesos físicoquímicos que explican la consistencia de estos productos. Durante el picado de la carne se produce una ruptura más o menos intensa de las fibras musculares y como consecuencia las proteínas de la carne quedan expuestas a la acción de la sal, la cual origina un aumento de la fuerza iónica que provoca la solubilización de las mismas. Las proteínas solubilizadas actúan como cemento de unión entre los componentes insolubles de la matriz proteica

(partículas de carne y de grasa), orientándose sobre éstas de manera que sus grupos lipófilos se adsorben a las partículas de grasa y se aglutinan las partículas de carne (interacciones proteína-grasa y proteína-proteína). Posteriormente y debido al descenso del pH durante la acidificación, próximo al punto isoeléctrico de las proteínas, 5,3, se produce la insolubilización de las proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas y como consecuencia el sol que rodea a las partículas se convierte en un gel. La desnaturalización de las proteínas provoca una disminución de la capacidad de retención del agua lo cual favorece la desecación del producto. La progresiva desecación contribuye a la consolidación del gel y a la consistencia y textura del embutido.

El proceso de gelificación, necesario para que los productos crudos curados adquieran la consistencia que les caracteriza, es muy complejo y depende de varios factores como son: el trabajo mecánico, la concentración de sales y el pH. La masa cárnica antes de ser embutida es sometida a distintos tipos de trabajo mecánico, los más comunes son: mezclado, masajeado y malaxado.

Todas estas operaciones se caracterizan por provocar una rotura celular que favorece la liberación de las proteínas miofibrilares, es decir, aumenta la extracción proteica. Posteriormente estas proteínas se solubilizan y se introducen en la estructura vacía de la fibra muscular, permitiendo una unión más firme entre la matriz proteica y la superficie de la carne. El pH tiene un doble papel en el proceso de gelificación, por un lado cuando aumenta se incrementa la solubilidad de las proteínas miofibrilares que actúan como solución ligante, pero por otro lado el descenso del pH es imprescindible para que se produzca la formación del gel por insolubilización y precipitación de las proteínas, principalmente las sarcoplásmicas (Schmidt, 1994).

Humedad

La humedad es un parámetro que, entre otros factores, está influenciado por el grado de picado de la masa cárnica y ésta puede ser la causa de la diferencia en el contenido final de humedad de nuestros embutidos con

respecto a los de otros trabajos similares. Los valores más bajos de humedad recogidos en la bibliografía corresponden a productos que fueron picados con una placa de 3 mm (Astiasarán *et al.*, 1990a; Chasco *et al.*, 1992a; Chasco *et al.*, 1993). El grado de picado más grueso favorece procesos de desecación más lentos, esto ya fue observado por Keller *et al.* (1974) que obtuvieron mayores pérdidas en los embutidos con picado más fino, que en los de picado grueso, durante las últimas fases del período de maduración. En trabajos más recientes, también se ha comprobado que en chorizos de picado grueso los valores finales de humedad superaban el 45 % (Berriain *et al.*, 1989; Berriain *et al.*, 1990; Astiasarán *et al.*, 1990; Cid *et al.*, 1992).

Cambios en los compuestos nitrogenados

Las proteínas son, junto a las grasas, los componentes mayoritarios de la materia seca de los productos cárnicos y constituyen el sustrato de una serie de reacciones bioquímicas que dan lugar a grandes modificaciones de la calidad sensorial de los embutidos, fundamentalmente relacionadas con la textura, el aroma y el sabor.

Básicamente toda la proteína presente en el embutido procede de la carne. Recordemos que el tejido muscular contiene como promedio un 19 % de proteínas, que se pueden englobar en tres tipos: miofibrilares, sarcoplásmicas y del tejido conectivo. Las proteínas miofibrilares (solubles en soluciones salinas de alta fuerza iónica) son la fracción mayoritaria y constituyen aproximadamente el 55 % de la proteína total del tejido muscular. Esta fracción engloba distintos tipos de proteínas pero las más abundantes son la miosina y la actina que conforman, respectivamente, el filamento grueso y delgado del sarcómero. Las proteínas sarcoplásmicas (solubles en agua y en soluciones salinas diluidas) constituyen el 25-30 % de la proteína total del tejido muscular y engloba a enzimas y mioglobina. Finalmente las proteínas del tejido conectivo constituyen una fracción insoluble en soluciones salinas y su representante mayoritario es el colágeno.

Los cambios que se producen en los compuestos nitrogenados de los embutidos durante la maduración están relacionados fundamentalmente con dos fenómenos: la solubilización y la proteólisis de las proteínas. El fenómeno de la solubilización de las proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas se produce en los primeros estadios de la maduración como consecuencia del aumento de la fuerza iónica por la adición de sal y es el principal responsable del desarrollo de la textura y consistencia de los productos crudos curados.

El fenómeno de proteólisis se debe principalmente a la actividad de las enzimas proteolíticas de origen microbiano y muscular. Esta actividad provoca un incremento del nitrógeno no proteico (NNP) compuesto por distintas fracciones como péptidos, aminoácidos libres, aminas, amoniaco y amonio. La composición y concentración de estos compuestos determinará a largo plazo el aroma y sabor final de los embutidos crudos curados (De Ketelaere *et al.*, 1974).

Un grupo microbiano involucrado en la maduración de los embutidos y que también participa en los procesos proteolíticos es el de las micrococáceas que incluye a los géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus*. Sajber *et al.*, (1971) señalaron que la presencia de micrococos en el embutido incrementaba la concentración de aminoácidos libres; posteriormente Lücke y Hechelman (1986) confirmaron la actividad proteolítica de estos microorganismos.

Cambios en los compuestos lipídicos

Los lípidos constituyen el componente mayoritario de los embutidos crudos curados y al igual que las proteínas, también sufren cambios a lo largo del proceso de maduración. La degradación y transformación de los lípidos da lugar a la aparición de un gran número de moléculas que van a ser responsables en parte del desarrollo del aroma y sabor típicos de los embutidos.

La modificación de los compuestos lipídicos durante la maduración de los embutidos abarca complejos mecanismos que aún no son bien conocidos

pero que incluyen una primera fase de lipólisis y otra posterior de oxidación. La degradación hidrolítica de las grasas origina la liberación de ácidos grasos libres y se produce por la acción de las lipasas del tejido adiposo y de las aportadas por los microorganismos involucrados en el proceso de maduración de los embutidos (micrococos y lactobacilos, principalmente). Los cambios oxidativos se producen sobre los ácidos grasos insaturados originando la producción de peróxidos, compuestos carbonilos y moléculas de pequeño peso molecular como alcoholes y ácido carboxílico; también estos cambios se deben, en parte, al metabolismo bacteriano.

Los fenómenos hidrolíticos implican la rotura del enlace éster de los triglicéridos de la grasa por acción de las enzimas lipolíticas o lipasas. Esto origina un descenso continuo del contenido de triglicéridos durante la maduración con la consiguiente acumulación de compuestos de menor peso molecular como ácidos grasos libres, diglicéridos y en menor medida monoglicéridos o glicerol, cuando la hidrólisis afecta a las tres posiciones de esterificación del triglicérido. Al final del proceso de maduración los ácidos grasos libres representan aproximadamente el 5 % del contenido total de ácidos grasos (Demeyer *et al.*, 1974).

Desarrollo de color de productos cárnicos madurados

El color es una de las características más importantes de la carne, ya que es el principal atributo que juzga el consumidor antes de comprar cualquier producto cárnico. El curado de la carne se ha realizado tradicionalmente añadiendo sal (cloruro sódico) y se ha observado que además de la acción conservante se forma un color rojo en el producto final que es muy apreciado por los consumidores. Esta variación de color de la carne se ha denominado “enrojecimiento”. Este proceso incluye una serie de complejas reacciones en las que las bacterias presentes en el embutido reducen el nitrato a nitrito que, posteriormente y mediante reacciones químicas, es reducido a óxido nítrico, el cual reacciona con los pigmentos hemo de la carne para formar el deseado color rojo del curado.

El color normal de las carnes curadas depende de tres factores: la concentración de pigmentos en los tejidos, el grado de conversión del pigmento nitrosilado y el estado de las proteínas de la carne. Durante la maduración en el embutido crudo se encuentran simultáneamente diversos pigmentos (mioglobina, metamioglobina, nitrosomioglobina y nitrosomiocromógeno) formando una mezcla. El color resultante y la estabilidad del mismo dependen de la preponderancia cuantitativa de los diferentes compuestos coloreados.

El embutido crudo exhibe el color del curado cuando se ha transformado aproximadamente la mitad del pigmento en nitrosomioglobina o nitrosomiocromógeno, pero este color no se estabiliza hasta que no se consigue el 75 % del pigmento transformado. Por otro lado si las proteínas tisulares permanecen en su mayoría no desnaturalizadas y la estructura celular es relativamente traslúcida, la luz penetra profundamente en los tejidos obteniéndose coloraciones de la carne más oscuras, en cambio, si las proteínas están desnaturalizadas, son opacas, y reflejan más luz, originando coloraciones más claras.

Asimismo, se produce la fermentación de los carbohidratos a cargo de las bacterias lácticas que origina la acidificación del producto. A pH inferiores a 5,5 se produce la reducción de los nitritos a óxido nítrico, que puede producirse por la acción de microorganismos reductores o bien, de forma espontánea favorecida por la presencia de moléculas reductoras en el medio acidificado. Posteriormente el óxido nítrico se une a la mioglobina formando la nitroso-mioglobina o nitrosil-mioglobina que constituye el pigmento característico del curado. Este pigmento es más estable que la mioglobina original pero aún conserva gran parte de su reactividad, por lo que es fácil que sufra reacciones de oxidación que lo transforman en metamioglobina confiriendo un indeseable color marrón (Coretti, 1971).

La adición de sustancias reductoras como el ácido ascórbico o el ascorbato sódico puede potenciar notablemente el enrojecimiento, ya que favorece la reducción del nitrito a óxido nítrico y del Fe^{3+} de la metamioglobina a Fe^{2+} de la oximioglobina. Permitiendo de esta forma

reducir las cantidades de nitrito teóricamente necesarias para la transformación de la mioglobina en nitrosomioglobina.

2.4.7. TIEMPO DE VIDA ÚTIL

La vida útil o vida de almacén de un producto alimenticio es el periodo de tiempo transcurrido desde su obtención hasta que se convierte en inaceptable en términos de seguridad o calidad.

La determinación exacta de la vida útil preocupa a todos los productores distribuidores, detallistas, Su sobrestimación podría llevar a la pérdida de ventas de un producto por falta de confianza de los consumidores, mientras que su subestimación sería económicamente peligrosa (Forsythe S. y Hayes P., 2002).

Sin embargo, establecer la vida útil no es tarea fácil ya que cada producto se compone de una serie singular de ingredientes y la temperatura de tratamiento y el sistema de distribución también influyen en su carga microbiana específica. Otra aplicación adicional son los cambios en las normas que regulan la conservación de los alimentos. Las técnicas para establecer la vida útil de un producto son:

1. Basándose en experiencias previas, predecir la posibilidad de que el microorganismo específico se encuentre en el alimento.
2. Producción a escala piloto, seguida de almacenamiento, análisis microbiológico y aceptación organoléptica.

No obstante, los embutidos secos-fermentados dependen no solamente en la fermentación para alcanzar la textura y sabor deseados, pero durante sus largos períodos de ripening ocurren otros procesos tanto bioquímicos y físicos. Procesos prolongados de secado y ripening llevan a que el producto presente un contenido bajo de humedad. El contenido final de humedad de embutidos secos-fermentados es siempre menor al 35%, siendo en algunos casos aún menores que 30%. Esto corresponde a una actividad de agua de 0,90 y menor, lo que hace que el producto sea auto-estable, debido a la combinación de factores como: baja humedad, pH menor a 5,3, moderada

acidez del producto fermentado, presencia de bacteriocinas producto del metabolismo de los cultivos iniciadores. Bajo condiciones climáticas moderadas y almacenamiento (por ejemplo 20°C y 70-75% de humedad relativa), los productos tienen una prolongada vida útil de cerca de un año (HEINZ & HAUTZINGER, 2007).

2.4.8. SEGURIDAD BIOLÓGICA DE LOS EMBUTIDOS FERMENTADOS

Los embutidos fermentados presentan una seguridad biológica igual o incluso superior a otros productos cárnicos que reciben un tratamiento térmico durante su manufactura o antes del consumo. Sin embargo, se han descrito brotes de salmonelosis, *Staphylococcus aureus* enterotoxigénicos, y recientemente, infecciones por cepas enterohemorrágicas de *Escherichia coli* por consumo de embutidos fermentados (Lücke *et al.*, 1998).

Enterobacterias: *Salmonella* y *Escherichia coli*

Durante el proceso de fermentación de los embutidos, el recuento de enterobacterias normalmente permanece constante o se incrementa como máximo un ciclo logarítmico. Los factores que favorecen el crecimiento de enterobacterias y por tanto, de *Salmonella* y *Escherichia coli*, incluyen una elevada actividad de agua, un pH inicial alto, una baja concentración de carbohidratos fermentables, un bajo número de lactobacilos en la mezcla de carne inicial, el uso de nitratos o niveles muy bajos de nitritos como agentes curantes (Hechelmann *et al.*, 1974; Lücke *et al.*, 1998).

Salmonella es el principal agente etiológico de enfermedades de origen alimentario (Mead *et al.*, 1999, Haeghebaert *et al.*, 2002). La Legislación Ecuatoriana exige ausencia de *Salmonella* en 25 g de producto (Norma NTE INEN 1 338:2010), pero son raros los casos de salmonelosis por ingestión de embutidos fermentados.

Schillinger y Lücke (1988) afirman que la disminución rápida del pH a niveles inferiores a 5,3 durante la fermentación es suficiente para inhibir el crecimiento de *Salmonella*. Durante el secado, las enterobacterias, incluyendo *Salmonella*, se inactivan lentamente (Kleemann y Bergann,

1996). La inhibición de *Salmonella* durante la maduración de embutidos depende en gran medida del tipo de producto. *Salmonella* se da con mayor frecuencia en embutidos frescos o poco fermentados que en embutidos secos más ácidos (Lücke *et al.*, 1998).

Además de *Salmonella*, otra enterobacteria que tiene gran importancia en embutidos debido a su elevada patogenicidad: *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). A diferencia de *Salmonella*, la dosis infectiva de EHEC es generalmente baja y no es necesario que se multiplique en el embutido para causar una infección. Además, la inactivación durante la maduración del embutido es lenta (aproximadamente un ciclo logarítmico en los experimentos de Glass *et al.*, 1992). Afortunadamente la prevalencia de EHEC es baja y limitada a carne de cordero y vaca (Bülte *et al.*, 1996). La legislación ecuatoriana establece un máximo de 10^2 ufc/g de *Escherichia coli* en los embutidos crudos curados (Norma NTE INEN 1 338:2010).

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus se encuentra frecuentemente en la carne fresca y en embutidos fermentados, pero generalmente en niveles bastante bajos (Lücke *et al.*, 1998). *Staphylococcus aureus* es un importante patógeno ya que combina la producción de toxinas con una importante capacidad invasiva y la resistencia a antibióticos. No tan sólo está relacionado con intoxicaciones alimentarias sino que también es un patógeno nosocomial muy común y está relacionado con enfermedades de adquisición comunitaria. El dramático incremento de la prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos, sobre todo a metilicina, en todo el mundo (Jacoby, 1996; Witte, 1999) se ha convertido en un importante problema clínico, dado que las cepas multiresistentes disminuyen la utilidad de los antibióticos en la medicina humana y limitan las opciones terapéuticas (Ehlert, 1999).

Staphylococcus aureus presenta una gran variedad de enzimas y toxinas que contribuyen a su patogenicidad y un grupo de toxinas, las enterotoxinas, causan intoxicaciones alimentarias (Balaban y Rasooly, 2000). Aun cuando

son necesarios recuentos superiores a 10^7 ufc/g de *Staphylococcus aureus* para generar niveles de enterotoxinas suficientes para causar una intoxicación, la legislación ecuatoriana exige recuentos de *Staphylococcus aureus* inferiores a 10^2 ufc/g (Norma NTE INEN 1 338:2010).

El desarrollo de *Staphylococcus aureus* ha sido estudiado durante la maduración de diversos tipos de embutidos. Este microorganismo se ve poco afectado por el contenido en sal y nitrito del embutido, pero en condiciones anaerobias y a temperatura y pH bajos se dificulta considerablemente su crecimiento (Lücke *et al.*, 1998).

Bacterias formadoras de esporas

Los embutidos fermentados pueden contener un elevado número de esporas de *Bacillus* spp. provenientes en su mayor parte de las especias adicionadas. Aunque muchas especies de *Bacillus* son responsables de síntomas de deterioro, como por ejemplo proteólisis, parece que las condiciones de baja a_w , bajo pH y ausencia de oxígeno son suficientes para controlar sus efectos en los embutidos fermentados (Lücke *et al.*, 1998).

Los clostridios, entre ellos *Clostridium botulinum*, pueden controlarse manteniendo un pH y a_w bajos, independientemente de la adición de nitrito. No existe evidencia práctica ni epidemiológica del crecimiento y producción de toxinas de los clostridios durante la maduración y almacenamiento de embutidos fermentados. La toxina botulínica ha sido detectada sólo si el embutido se elaboraba sin glucosa adicionada y se mantenía a elevadas temperaturas (32.2°C) durante largo tiempo (Christiansen *et al.*, 1975).

La legislación ecuatoriana establece un máximo para clostridios sulfito-reductores de 10^2 ufc/g (Norma NTE INEN 1 338:2010).

Mohos y micotoxinas

Los mohos colonizan la superficie de aquellos embutidos no ahumados y secados al aire. También pueden crecer en embutidos ahumados almacenados en condiciones de humedad y temperatura elevada. En los embutidos fermentados con mohos, *Penicillium* spp. predomina y las

especies aisladas con mayor frecuencia son *P. verrucosum*, *P. chrysogenum*, *P. frequentans*, *P. nalgiovense* y *P. variable*. *Aspergillus* spp. puede competir con *Penicillium* spp. pero sólo en temperaturas de almacenamiento elevadas y baja aw (Lücke, 1998).

Las aflatoxinas y otras toxinas de *Aspergillus* se han detectado sólo en embutidos madurados a elevadas temperaturas y humedades relativas altas, condiciones que no suelen prevalecer en la práctica comercial (Álvarez-Barrea *et al.*, 1982).

Normalmente, la maduración y secado de los embutidos fermentados se realiza a temperaturas de 15°C o inferiores, de forma que *Aspergillus* spp. es desplazado por *Penicillium* spp. y *Scopulariopsis* spp. (Incze *et al.*, 1976). En cuanto a las toxinas de *Penicillium*, pequeñas cantidades de citreoviridina y rugulosina pueden formarse en la capa más externa del embutido (Scheuer, 1995).

En los embutidos madurados con mohos, el crecimiento de mohos no deseados puede ser inhibido inoculando la superficie con una cepa no tóxica apropiada. En otros embutidos fermentados, el crecimiento de mohos se inhibe por otros métodos, como por ejemplo, sumergiendo los embutidos en soluciones de sorbato potásico o primaricina al final del período de fermentación (Lücke *et al.*, 1998). Sin embargo, el uso de primaricina para la preservación de los embutidos fermentados está prohibido en muchos países dado que este antimicrobiano se usa también en quimioterapia humana.

2.4.9. CRECIMIENTO DE POBLACIONES MICROBIANAS

El crecimiento se define como un aumento en el número de células microbianas de una población; también puede medirse como un incremento de la masa celular. La *velocidad de crecimiento* es el cambio en el número de células o en la masa celular experimentado por unidad de tiempo. Durante el ciclo de división celular, todos los componentes estructurales de la célula se duplican. El intervalo para la formación de dos células a partir de una supone una *generación*, y el tiempo transcurrido para que esto ocurra se

llama *tiempo de generación*. Por tanto, el *tiempo de generación* es el tiempo que se requiere para que la población se duplique, razón por la cual a veces el tiempo de generación se llama tiempo de duplicación. Durante cada generación, tanto el número de células como la masa celular se duplican. Los tiempos de generación varían ampliamente entre los distintos microorganismos. Muchas bacterias tienen tiempos de generación comprendidos entre 1-3 horas, pero unas cuantas crecen muy rápidamente y se dividen en tan solo 10 minutos mientras que otras tardan varios días. Además, el tiempo de generación de un microorganismo determinado también es función del medio de cultivo utilizado y de las condiciones de incubación empleadas.

Crecimiento exponencial

El modelo de incremento en la masa celular, en el que en cada período fijo de tiempo se duplica el número de células, se denomina *crecimiento exponencial*. Cuando en un sistema de coordenadas se representa aritméticamente el número de células de un experimento en función del tiempo transcurrido, se obtiene una curva cuya pendiente aumenta constantemente. Sin embargo, es difícil obtener información sobre el crecimiento a partir de este tipo de curvas. Si, se representa el número de células en una escala logarítmica (\log_{10}) y el tiempo en una escala aritmética (resultando una gráfica semilogarítmica) obtendremos una línea recta. Esta función lineal es un indicador inmediato de que las células están creciendo exponencialmente. Además, las gráficas semilogarítmicas son adecuadas y simples de usar para determinar tiempos de generación a partir de una serie de resultados. El tiempo de generación puede deducirse directamente de este tipo de representaciones.

Una característica del crecimiento exponencial es que la velocidad del aumento del número de células es inicialmente lenta pero incrementa cada vez más con el tiempo. Esto determina que en las últimas etapas el aumento del número de células sea realmente explosivo. Una consecuencia práctica del crecimiento exponencial es que cuando un producto no estéril, como la leche, se deja en condiciones que permiten el crecimiento microbiano unas

cuantas horas, durante las primeras fases del crecimiento exponencial el efecto no es muy relevante, mientras que si se deja durante el mismo tiempo en fase exponencial tardía el resultado es adverso para el producto.

Parámetros de crecimiento microbiano

El aumento en número de células que se produce en un cultivo bacteriano creciendo exponencialmente es una progresión geométrica en base 2. Cuando dos células se dividen se convierten en cuatro y esto se puede expresar como $2^1 \rightarrow 2^2$. Cuando cuatro células pasan a ocho, lo expresamos como $2^2 \rightarrow 2^3$, y así sucesivamente. Debido a esta progresión geométrica, existe una relación directa entre el número de células presentes inicialmente en un cultivo y el número presente tras un período de crecimiento exponencial:

$$N = N_0 2^n$$

Donde N = número final de células, N_0 = número inicial de células y n = número de generaciones que han ocurrido durante el período de crecimiento exponencial. El tiempo de generación g , de la población celular se calcula como t/n , donde t indica simplemente las horas o minutos de crecimiento exponencial. Por tanto, sabiendo el número inicial y final de células en una población que está creciendo exponencialmente, es posible calcular n ; y conociendo n y t , calcular el tiempo de generación g .

Para expresar n a partir de la ecuación $N = N_0 2^n$, se necesita hacer las siguientes transformaciones:

$$N = N_0 2^n$$

$$\log N = \log N_0 + n \log 2$$

$$\log N - \log N_0 = n \log 2$$

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2} = \frac{\log N - \log N_0}{0,301}$$

$$n = 3,3 (\log N - \log N_0)$$

Expresando n en función de términos fácilmente medibles como N y N_0 , se pueden calcular los tiempos de generación.

El tiempo de generación g , también se puede calcular a partir de la pendiente de la recta obtenida en representación semilogarítmica del crecimiento exponencial, pues la pendiente tiene un valor de $0,301/g$.

Otro índice de la velocidad de crecimiento es la *constante de velocidad de crecimiento*, abreviadamente k . la constante de la velocidad de crecimiento se expresa como: $k = \frac{\ln 2}{g} = \frac{0,693}{g}$ y tiene unidades de hora⁻¹. Mientras que g es una medida del tiempo que tarda una población en duplicar su número de células, k es una medida del número de generaciones que ocurren por unidad de tiempo en un cultivo exponencial.

Si disponemos de los valores de n y de t , se puede calcular g y k para diferentes microorganismos creciendo bajo diferentes condiciones de cultivo. Esto resulta a veces útil para optimizar las condiciones de cultivo de un microorganismo particular y también para probar el efecto positivo o negativo de algún tratamiento sobre el cultivo bacteriano (Brock, 2002).

2.2.5. HIPÓTESIS

2.5.1. Hipótesis Nula (H_0)

El Uso de Bactoferm™ LHP (*Pediococcus acidilactici* & *Pediococcus pentosaceus*), Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*), Bactoferm™ F-LC (*Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus* and *Staphylococcus xylosus*) y Cultivo lácteo SLB 95₃ (*Lactobacillus bulgaricus* & *Streptococcus thermophilus*), y el tiempo de estufaje no influyen significativamente en la elaboración de chorizo (tipo Ambateño) madurado

2.5.2. Hipótesis Alternativa (H_1)

El Uso de Bactoferm™ LHP (*Pediococcus acidilactici* & *Pediococcus pentosaceus*), Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*), Bactoferm™ F-LC (*Pediococcus acidilactici*,

Lactobacillus curvatus and *Staphylococcus xylosus*) y Cultivo lácteo SLB 95₃ (*Lactobacillus bulgaricus* & *Streptococcus thermophilus*), y el tiempo estufaje influyen significativamente en la elaboración de chorizo (tipo Ambateño) madurado

2.2.6. SEÑALAMIENTO DE VARIABLES DE LA HIPÓTESIS

2.6.1. Variable Independiente:

El Uso de Bactoferm™ LHP (*Pediococcus acidilactici* & *Pediococcus pentosaceus*), Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*), Bactoferm™ F-LC (*Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus* and *Staphylococcus xylosus*) y Cultivo lácteo SLB 95₃ (*Lactobacillus bulgaricus* & *Streptococcus thermophilus*)

2.6.2. Variable Dependiente:

Elaboración de chorizo (tipo Ambateño) madurado cuyos principales indicadores son: pH, acidez titulable, pérdida de peso, calidad sensorial (olor, sabor, color, aceptabilidad)

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

6.1. ENFOQUE

El enfoque del trabajo de investigación fue de tipo cuali-cuantitativo. El trabajo de investigación fue cuantitativo debido a que en los procesos de maduración y secado se midieron propiedades físico-químicas del producto tales como: humedad relativa, pH, acidez, tiempo de vida útil, recuento microbiano. Y fue de tipo cualitativo debido a que se realizó la evaluación sensorial del producto terminado. Dicha evaluación se llevó a cabo mediante la aplicación de pruebas de análisis sensorial por un grupo de catadores no entrenados.

6.2. MODALIDAD BÁSICA DE LA INVESTIGACIÓN

El trabajo de investigación se respaldó en una modalidad “Bibliográfica-documental” puesto que consistió en la recopilación de información, acerca del uso de microorganismos iniciadores en la elaboración de productos cárnicos madurados como chorizo (tipo Ambateño), así como su influencia en el desarrollo de las características sensoriales y físico-químicas del chorizo.

Complementariamente tuvo una modalidad básica de investigación experimental, puesto que consistió en la evaluación de las diferentes características que atribuyen calidad al chorizo (tipo Ambateño) madurado de cada uno de los tratamientos establecidos, que relacionaron a la variable dependiente e independiente.

6.3. NIVEL O TIPO DE INVESTIGACIÓN

Para la ejecución del trabajo de investigación se utilizaron los siguientes tipos de investigación:

Exploratoria: ya que se identificaron los efectos que generan las distintas mezclas de microorganismo iniciadores, el tipo de empaque y el tiempo de estufaje en la calidad del chorizo (tipo Ambateño) madurado; permitiendo establecer el mejor tratamiento, mediante la medición de indicadores como: pH, acidez titulable, pérdida de peso.

Descriptiva: puesto que se comparó la calidad de los diferentes chorizos elaborados, en función al tipo de tratamiento y condición de elaboración, aplicando técnicas de análisis estadístico.

Asociación de variables: debido a que se evaluó cómo influyen: el tipo de mezcla de microorganismo y la temperatura de estufaje en el descenso de pH, incremento de acidez titulable y secado del chorizo. Además se estableció las curvas de cinética microbiana de los microorganismos iniciadores del mejor tratamiento.

6.4. EXPERIMENTACIÓN

Según Saltos (1993), del mismo modo que para el éxito de una empresa se requiere aplicar una buena estrategia de financiamiento y mercadeo, la ejecución de una investigación o tecnológica eficiente necesitará de un adecuado diseño experimental.

Por lo tanto, para el cumplimiento eficaz de los objetivos propuestos en el trabajo de investigación, se consideró un diseño experimental que abarque el tipo de mezcla de microorganismos iniciadores, y el tiempo de estufaje del producto.

Se aplicó un diseño experimental completamente aleatorizado en arreglo factorial AxB de 8 tratamientos con dos repeticiones de cada indicador planteado. Por lo tanto se tienen en cuenta los siguientes factores y niveles:

FACTOR A: Tipo de Mezcla de Microorganismos Iniciadores

a_0 = Bactoferm™ LHP (*Pediococcus acidilactici* & *Pediococcus pentosaceus*)

a_1 = Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*)

a_2 = Bactoferm™ F-LC (*Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus xylosus*)

a_3 = Cultivo lácteo SLB 95₃ (*Lactobacillus bulgaricus* & *Streptococcus thermophilus*)

FACTOR B: Tiempo de estufaje

b_0 = 16 horas

b_1 = 24 horas

TRATAMIENTOS

Se detallan a continuación los tratamientos planteados:

Tabla 6. Reporte de ocho tratamientos producto de la combinación de los factores A y B.

N°	Tratamientos	Descripción
1	a_0b_0	Bactoferm™ LHP – 16 horas estufaje
2	a_0b_1	Bactoferm™ LHP – 24 horas estufaje
3	a_1b_0	Bactoferm™ F-RM-52 – 16 horas estufaje
4	a_1b_1	Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje
5	a_2b_0	Bactoferm™ F-LC – 16 horas estufaje
6	a_2b_1	Bactoferm™ F-LC – 24 horas estufaje
7	a_3b_0	Cultivo lácteo SLB 95 ₃ – 16 horas estufaje
8	a_3b_1	Cultivo lácteo SLB 95 ₃ – 24 horas estufaje

Fuente: Diseño propuesto por el autor.

Elaborado por: Sarabia López Lenin Daniel

Diseño AxB

Modelo matemático tomado de Cochram (1973)

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + \beta_j + (AB)_{ij} + R_k + \varepsilon_{ijk}$$

Dónde:

μ : Efecto global

A_i : Efecto del i-ésimo nivel del factor A; $i = 1, \dots, a$

B_j : Efecto del j-ésimo nivel del factor B; $j = 1, \dots, b$

AB_{ij} : Efecto de la interacción de los factores A y B

R_k : Efecto de las réplicas; $k = 1, \dots, r$

ϵ_{ijk} : Residuo o error experimental

Lo anterior permitió evaluar el efecto combinado de los factores indicados, en la calidad del chorizo (tipo Ambateño) madurado. Evaluándose de ésta forma 8 tratamientos con 1 réplica, correspondiente a 16 corridas y estos se ejecutaron aleatoriamente.

La obtención de las respuestas experimentales implicaron, primero determinar la calidad del chorizo (tipo Ambateño) madurado, para ello se evaluaron los siguientes parámetros: pérdida de peso, pH, acidez titulable.

Además, se analizó la calidad sensorial del chorizo (tipo Ambateño) madurado, con lo cual se estableció el mejor tratamiento; para ello se trabajó con un diseño factorial de bloques incompletos, en el que intervinieron los siguientes factores: tratamientos y catadores. Los 14 catadores no entrenados (Tabla 6) fueron escogidos aleatoriamente, quienes siguieron la hoja de cata específica (Anexo E).

Para la evaluación sensorial del chorizo (tipo Ambateño) madurado, se consideraron los siguientes atributos de calidad: color, aceptabilidad, sabor y olor. Al mejor tratamiento, se analizó: composición proximal, cinética de desarrollo de los microorganismos iniciadores, y tiempo de vida útil.

Diseño de Bloques Incompletos**Modelo matemático tomado de Cochram (1973)**

$$Y_{ij} = \mu + \beta_i + T_j + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

μ : Efecto global

B_i : Efecto del i-ésimo bloque

T_j : Efecto del j-ésimo bloque

ϵ_{ij} : Residuo o error aleatorio

Tabla 7. Distribución de las muestras para los catadores según el diseño de bloques incompletos para ocho (8) tratamientos.

Catador	Tratamiento							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	x	x	x	x				
2					x	x	x	x
3	x	x					x	x
4			x	x	x	x		
5	x		x			x		x
6		x		x	x		x	
7	x			x		x	x	
8		x	x		x			x
9	x	x			x	x		
10			x	x			x	x
11	x		x		x		x	
12		x		x		x		x
13	x			x	x			x
14		x	x			x	x	

Fuente: Diseños Experimentales, Cochram (1973)

Hipótesis

Para el diseño experimental de bloques incompletos se planteó la siguiente hipótesis nula:

H_0 : No existe diferencia significativa entre los tratamientos, en la calidad sensorial del chorizo (tipo Ambateño) madurado.

6.5. POBLACIÓN Y MUESTRA

Para el trabajo experimental descrito se consideró como población a los estudiantes de la Universidad Técnica de Ambato y como muestra a los alumnos de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, mismos que fueron escogidos aleatoriamente para la determinación de la calidad sensorial del chorizo (tipo Ambateño) madurado en base a una evaluación organoléptica.

6.6. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Cuadro 1. “Variable Independiente: “Efecto del Uso de Bactoferm™ LHP (*Pediococcus acidilactici* & *Pediococcus pentosaceus*), Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*), Bactoferm™ F-LC (*Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus* and *Staphylococcus xylosus*) y Cultivo lácteo SLB 95₃ (*Lactobacillus bulgaricus* & *Streptococcus thermophilus*)”

Conceptualización	Categorías	Indicadores	Ítems	Técnicas e Instrumentos
La utilización de cultivos microbianos capaces de desarrollarse en un producto cárnico tipo chorizo (ambateño) madurado, de los cuales se emplearán diferentes mezclas de microorganismos en la formulación del producto.	Cultivos microbianos iniciadores	<ul style="list-style-type: none"> • Especificidad • Viabilidad 	¿Se pueden utilizar microorganismos específicos que sean viables en la elaboración de un producto cárnico madurado?	<ul style="list-style-type: none"> • Revisión bibliográfica • Libros • Artículos técnicos
	Tipo de mezcla de microorganismos iniciadores	<ul style="list-style-type: none"> • Acidificadores • Mejoradores del aroma 	¿Hay diferencia en la calidad del producto cárnico madurado con el uso de microorganismos acidificadores y mejoradores del aroma?	<ul style="list-style-type: none"> • Información Secundaria • Libros • Artículos técnicos • Fichas • Hojas técnicas

Elaborado por: Lenin Sarabia; 2011

Cuadro 2. “Variable Dependiente: “Elaboración de Chorizo (tipo Ambateño) madurado”

Conceptualización	Categorías	Indicadores	Ítems	Técnicas e Instrumentos
<p>El chorizo madurado es un producto cárnico crudo-curado-madurado elaborado con carnes de res, cerdo, grasa, especias varias y cultivos iniciadores. Embutido en tripas naturales o no. Su calidad está determinada por aspectos organolépticos, microbiológicos y tiempo de vida útil.</p>	Chorizo madurado	<p>Rebanabilidad Pérdida de peso pH acidez titulable</p>	<p>¿El tipo de mezcla de microorganismos iniciadores utilizados influye en las características físico – químicas del chorizo (tipo ambateño) madurado?</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Información Secundaria • Libros • Artículos técnicos • Fichas
	Calidad sensorial	<p>Color Olor Sabor Aceptabilidad</p>	<p>¿Hay diferencia en la calidad sensorial entre los tratamientos de chorizo (tipo ambateño) madurado?</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Panel de catación • Encuesta • Hojas de catación
	Tiempo de vida útil	<p>Análisis microbiológico</p>	<p>¿El recuento microbiano del producto se encuentra dentro de los límites permisibles?</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Norma NTE INEN 1338:2010
	Análisis proximal	<p>Humedad Proteína Grasa Carbohidratos Cenizas</p>	<p>¿El producto presenta un contenido proximal acorde a normas vigentes?</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Norma NTE INEN 1338:2010

Elaborado por: Lenin Sarabia; 2011

6.7. RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN

La recolección de datos se realizó mediante tablas, y posteriormente los cálculos correspondientes se observaron simplificadaamente mediante gráficos.

En la elaboración de chorizo (tipo Ambateño) maduro se registraron los siguientes datos por duplicado:

- pH, con el empleo de un pH-metro
- Pérdida de peso, con el uso de una balanza analítica
- Acidez titulable, con el uso de una bureta graduada
- Calidad sensorial mediante evaluación organoléptica, aplicando la hoja de cata propuesta en el Anexo E.

Con los resultados de la evaluación organoléptica se estableció el mejor tratamiento, al cual se aplicaron estudios de:

- Cinética de crecimiento de microorganismos iniciadores
- Tiempo de vida útil
- Análisis proximal: (humedad, proteína, grasa, sólidos totales, cenizas)
- Rebanabilidad
- Calidad microbiológica: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*

6.8. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS

En acuerdo con lo expuesto por Herrera L. (et. al), se realizó el análisis de los resultados estadísticos, destacando tendencias o relaciones fundamentales de acuerdo con los objetivos e hipótesis.

Para evaluar la información, se empleó el programa de Excel, en el que se analizaron las tablas y resultados obtenidos durante la fase experimental. Para el análisis de las propiedades físicas del chorizo (tipo Ambateño) madurado, evaluación sensorial, propiedades químicas y calidad microbiológica, se empleó el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion XV.

6.8.1. TRATAMIENTOS

Para la elaboración de chorizo (tipo Ambateño) madurado, se utilizó la siguiente formulación:

Tabla 8: Formulación para Chorizo (tipo Ambateño) madurado

INGREDIENTES	CANTIDAD (%)
Carne de res	54,55
Carne de cerdo	22,72
Tocino	22,73
Total:	100
Condimentación para 2 kg de mezcla cárnica	
Agua Helada	91 g
Comino	50 g
Orégano	50 g
GMS	50 g
Eritorbato	150 ppm
Ac. Sórbico	150 ppm
Ac. Ascórbico	150 ppm
Fosfato K7	14 g
Sal	1,40 g
Nitrito	150 ppm
Achiote (polvo)	1.20 g
Cebolla fresca	50 g
Ajo fresco	50 g

Fuente: Lenin Daniel Sarabia

Elaborado por: Lenin Daniel Sarabia

Cabe indicar que la formulación utilizada para elaborar chorizo (tipo Ambateño) madurado fue la misma para todos los tratamientos experimentales, con la única variación en el tipo de cultivo iniciador empleado, los que han sido definidos anteriormente en ésta sección.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

8.1. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Los resultados de las distintas determinaciones realizadas en el Laboratorio de Procesamiento Industrial de Alimentos, de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos (FCIAL), de la Universidad Técnica de Ambato (UTA); Laboratorio de Análisis Ambiental e Inspección, del Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental (LAB-CESTTA) de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH); se presentan en el Anexo A.

Allí se pueden apreciar las respuestas experimentales de: descenso de pH, acidez titulable (% ácido láctico) y pérdida de peso de los tratamientos experimentales durante el proceso de fermentación; evaluación sensorial al final del proceso de maduración de los tratamientos experimentales; análisis de calidad microbiológica (coliformes, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella*), rebanabilidad, cinética de crecimiento (*Staphylococcus carnosus* y *Lactobacillus curvatus*), análisis proximal y tiempo de vida útil del mejor tratamiento experimental.

8.2. INTERPRETACIÓN DE DATOS

8.2.1. Materia prima

La carne de res utilizada se adquirió de la vendedora de carne Sonia Sánchez del puesto #10 del mercado Central del cantón Ambato, provincia

de Tungurahua; la carne de cerdo y grasa de cerdo se adquirió del distribuidor de carne Mr. Chancho “Skandinavo” del cantón Ambato, provincia de Tungurahua. La carne fue seleccionada en el laboratorio de Procesamiento Industrial de Alimentos de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos (FCIAL), de la Universidad Técnica de Ambato (UTA).

Los condimentos empleados tales como: comino, glutamato mono sódico, sal, dextrosa, ácido ascórbico, polifosfato de potasio, sal y nitrito fueron adquiridos del Frigorífico “El Valle” del cantón Ambato, de la provincia de Tungurahua.

Los cultivos iniciadores utilizados fueron: Bactoferm™ LHP (*Pediococcus acidilactici* & *Pediococcus pentosaceus*), Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*), Bactoferm™ F-LC (*Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus* and *Staphylococcus xylosus*) y Cultivo lácteo SLB 95₃ (*Lactobacillus bulgaricus* & *Streptococcus thermophilus*), agregados en cada uno de los tratamientos luego del proceso de mezclado, previa rehidratación durante 10 minutos en agua destilada, en las siguientes concentraciones respectivamente: 0,2 g/kg; 0,25 g/kg; 0,25 g/kg y 0,2 g/kg. Los cultivos iniciadores fueron suministrados por la empresa Butcher & Packer Supply Company – USA.

8.2.2. Respuestas experimentales

Fase de fermentación y maduración

pH

La evaluación de pH en un producto cárnico madurado es de suma importancia, debido a que durante las 24 horas posteriores a su elaboración es imperativo que el pH de la mezcla cárnica descienda hasta valores menores a 5,3. Lo anterior, permite la formación de una emulsión cárnica al alcanzarse el punto isoeléctrico de la carne; además, con valores de pH menores a 5,3 se consigue la inhibición de microorganismos patógenos como *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* que pudieran desarrollarse en el producto cárnico.

Por lo tanto, en los Anexos A y C, Tabla A-1 y Gráfico C-1 a C-8 se encuentran los resultados del descenso de pH en los tratamientos experimentales, los cuales manifestaron un rango de 6,71 – 6,99 al inicio de la fermentación, y luego de las primeras 24 horas de proceso el rango estuvo entre 5,78 – 5,13. Los resultados mencionados anteriormente, indican que los cultivos iniciadores utilizados influyeron en el descenso de pH del producto. No obstante, no todos los tratamientos presentaron un descenso de pH menor a 5,3.

En el Anexo B, Tabla B-1 se reporta el análisis de varianza de pH de los tratamientos experimentales a las 24 horas de fermentación; donde, a un nivel de confianza de 95%, se demostró que existe diferencias significativas en el factor A: Tipo de Cultivo Iniciador. Por lo tanto, rechaza la hipótesis nula para, que establece que no hay diferencias significativas en el descenso de pH del producto cárnico entre los distintos cultivos iniciadores.

Al realizar una prueba de rangos múltiples de Tukey HSD del factor A al 95% de confianza, expuesta en la Tabla B-2; se estableció que el nivel (α_1): cultivo Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*) manifestó un menor valor de pH, con una media igual a 5,14; mientras que el Cultivo lácteo SLB 95₃ (*Lactobacillus bulgaricus* & *Streptococcus thermophilus*), Bactoferm™ F-LC (*Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus* and *Staphylococcus xylosus*) y Bactoferm™ LHP (*Pediococcus acidilactici* & *Pediococcus pentosaceus*) poseen medias de 5,25; 5,71 y 5,73 respectivamente, las cuales son significativamente mayores para éste atributo evaluado.

Puesto que no existen diferencias significativas en el factor B: tiempo de estufaje; se establece que el tiempo de estufaje del producto cárnico no influye significativamente sobre el descenso de pH durante la fermentación de chorizo (tipo Ambateño) madurado.

Acidez titulable (% ácido láctico)

La formación de ácido láctico durante la fermentación de un producto cárnico madurado ocurre como resultado del metabolismo de los azúcares

presentes por parte de los microorganismos presentes en el producto. La cantidad de ácido depende de la eficiencia de conversión de los azúcares disponibles a ácido láctico y al tipo de microorganismo presente en la mezcla cárnica inicial.

En los Anexos A y C, Tabla A-4 y Gráficos C-9 a C-16 se reportan los resultados de acidez titulable (g ácido láctico/100g) durante la fermentación y maduración de los tratamientos experimentales. Se observó que durante las primeras 48 horas de proceso hubo una alta producción de ácido láctico en la mayoría de los tratamientos experimentales. Dicha producción principalmente debida a la acción de las bacterias ácido lácticas presentes en cada uno de los cultivos iniciadores, así: *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus pentosaceus* en Bactoferm™ LHP; *Lactobacillus curvatus* en Bactoferm™ F-RM-52; *Pediococcus acidilactici* y *Lactobacillus curvatus* en Bactoferm™ F-LC y *Lactobacillus bulgaricus* en Cultivo lácteo SLB 95₃.

Al no encontrarse un valor mínimo recomendado para acidez titulable en productos cárnicos madurados, la producción de ácido láctico estuvo en función al tipo de cultivo iniciador utilizado y la disponibilidad de azúcares fermentables. Por lo tanto, al término de la maduración se determinó que la cantidad de ácido láctico presente en los tratamientos experimentales estuvo entre un rango de 1,78% a 2,22%.

En el Anexo B, Tabla B-3 se reporta el análisis de varianza de acidez (g ácido láctico/100g) de los tratamientos experimentales a las 120 horas de maduración; donde, a un nivel de confianza de 95% se demostró que existen diferencias significativas en el factor A: Tipo de cultivo iniciador. De tal manera, se rechazó la hipótesis nula que establece que no existen diferencias significativas en la acidez titulable del producto elaborado entre los distintos cultivos iniciadores.

Por lo tanto al realizar una prueba de rangos múltiples de Tukey HSD del factor A al 95% de confianza, expuesta en la Tabla B-4, se estableció que el nivel (α_2): Bactoferm™ F-LC (*Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus* and *Staphylococcus xylosus*) presentó la mayor producción de ácido láctico,

con una media de 2,08%, mientras que entre los cultivos iniciadores Bactoferm™ LHP (*Pediococcus acidilactici* & *Pediococcus pentosaceus*), Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*) y Cultivo lácteo SLB 95₃ (*Lactobacillus bulgaricus* & *Streptococcus thermophilus*) no existen diferencias significativas en los valores de ácido láctico (%), con unas medias de 1,86%; 1,88% y 1,86% respectivamente.

Además, a un nivel de confianza de 95% se estableció que existen diferencias significativas en el factor B: tiempo de estufaje. En consecuencia, se rechazó la hipótesis nula que establece que el tiempo de estufaje no influye sobre la producción de ácido láctico en los tratamientos experimentales.

Así, en la Tabla B-5 se reporta la prueba de rangos múltiples de Tukey HSD para el factor B al 95% de confianza, se estableció que el nivel (b1): 24 horas de estufaje, presentó influencia en una mayor producción de ácido láctico en los tratamientos experimentales, con una media de 1,97%.

Pérdida de peso

La pérdida de peso de un producto cárnico durante la desecación posterior a la fermentación es imprescindible ya que en ella se produce una reducción de la actividad de agua (a_w) que en combinación con la disminución del pH hace que el embutido adquiera su capacidad de conservación, además de la consistencia adecuada (Frey, 1993).

En los Anexos A y C, Tabla A-5 y Gráficos C-17 a C-24 se reportan los resultados de pérdida de peso (%) de los tratamientos experimentales durante el proceso de maduración del producto. Se observó que durante las primeras 24 horas de procesamiento, ocurrió una pronunciada pérdida de peso en los tratamientos experimentales, lo cual se debió a la alta permeabilidad a vapor de agua y gases que presentó la tripa natural de cerdo utilizada. Por lo tanto, a las 120 horas de maduración la mayoría de los tratamientos experimentales presentaron valores de pérdida de peso entre 26,08% a 33,85%; por lo cual, se consideró finalizado el proceso de

secado, por cuanto se ha establecido que un producto madurado debe presentar una pérdida de peso de 30% a 35% (Frey, 1993).

Consecuentemente, en la Tabla B-6 se reporta el análisis de varianza de pérdida de peso (%) de los tratamientos experimentales a las 120 horas de maduración; en el cual, a un nivel de confianza de 95% se demostró que existen diferencias significativas en el factor A: Tipo de cultivo iniciador y el factor B: Tiempo de estufaje, en la pérdida de peso de los tratamientos experimentales. En consecuencia, se han rechazado las hipótesis nulas que establecen respectivamente que: “el tipo de cultivo iniciador no influye en la pérdida de peso de los tratamientos experimentales”, y que “el tiempo de estufaje no influye en la pérdida de los tratamientos experimentales”.

No obstante, al encontrarse diferencias significativas al 95% de confianza entre la interacción AB (Tipo de cultivo iniciador y Tiempo de estufaje), se estableció que la interacción a_0b_0 manifestó mayor pérdida de peso. Por lo tanto, el uso de Bactoferm™ LHP (*Pediococcus acidilactici* & *Pediococcus pentosaceus*) y 16 horas de estufaje, favorecieron un secado más rápido del producto cárnico.

Evaluación sensorial

La caracterización de un alimento es un proceso largo y complejo que normalmente involucrará a varias disciplinas científicas. El análisis sensorial debería ser una de ellas y, concretamente, la obtención del perfil descriptivo o «huella sensorial» del producto una parte fundamental de esa caracterización. Definir y describir qué características o atributos de un alimento son importantes sensorialmente y cómo deben medirse no es una tarea fácil, a pesar de encontrarse ampliamente descrita de forma genérica (Stone et al., 1974; Meilgaard et al., 1987; Stampanoni, 1993, Williams y Langron 1984; ISO 11035, 1994).

Transcurridos 15 días de maduración, se realizó el análisis sensorial de los chorizos elaborados. Se aplicó un diseño factorial de bloques incompletos con la finalidad de facilitar la evaluación de los tratamientos experimentales, de forma que se tuvieron 8 muestra de chorizo madurado,

los cuales fueron distribuidos en un número de 4 muestras a cada catador, el número de catadores utilizados fue de 15 personas, distribuidos entre 8 hombres y 7 mujeres, y se obtuvo 7 respuestas por tratamiento experimental.

Los catadores semi-entrenados empleados pertenecen a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, de la Universidad Técnica de Ambato, a quienes se solicitó evaluar: color, olor, sabor y aceptabilidad, utilizando la hoja de cata con una escala estructurada de 5 puntos (Anexo E), el ensayo se efectuó por duplicado.

Las respuestas experimentales obtenidas de los catadores de cada uno de los tratamientos experimentales se encuentran en el Anexo A, Tablas A-6, A-7, A-8, A-9, A-10, A-11, A-12 y A-13. A partir del análisis estadístico de las respuestas experimentales para los atributos analizados en el trabajo de investigación, se obtuvo el mejor tratamiento de chorizo (tipo Ambateño) madurado.

Color

El desarrollo de color en los tratamientos experimentales ocurrió como resultado de la reducción del nitrito de sodio durante el curado de la carne. Dicho proceso, sobrevino como resultado de los procesos químicos y bioquímicos ocurridos durante las primeras 24 horas de procesamiento.

Cabe indicarse que las bacterias presentes en los cultivos iniciadores fueron responsables de gran parte del proceso de curado del producto; debido a que por su influencia en el descenso del pH favorecieron a una mejor acción del curado y reducción del nitrito empleado, formando el complejo nitroso-mioglobina, color característico de un embutido madurado.

Así mismo, se menciona que bacterias tales como *Staphylococcus carnosus* y *Staphylococcus xylosum*, mismas que estuvieron presentes en los cultivos iniciadores, influyeron en el desarrollo de color en los tratamientos experimentales debido a su capacidad metabólica en el desarrollo de color de productos cárnicos madurados, como lo citan algunos autores.

En el Anexo B, Tabla B-8 se reporta el análisis de varianza efectuado sobre el atributo color evaluado por los catadores en la evaluación sensorial; en el cual, con un nivel de confianza del 95%, no se encontraron diferencias significativas tanto en el factor A: tratamiento experimental, como en el factor B: catador. Lo cual sugiere que independientemente del cultivo microbiano usado, así como del tiempo de estufaje empleado, el desarrollo de color de los tratamientos experimentales no manifestó diferencias significativas.

Por lo tanto, se estableció que la intensidad de color entre los tratamientos experimentales fue percibida de igual manera por parte de los catadores, quienes catalogaron que el color de los chorizo (tipo Ambateño) madurados estuvo en valores de 3 a 4 (Intenso a Muy Intenso) dentro de la escala hedónica utilizada, que equivalen respectivamente al 43,75% y 31,25% de la valoración suministrada por los catadores, como se observa en el Gráfico C-25.

Olor

En el Anexo B, Tabla B-9 se reporta el análisis de varianza efectuado sobre el atributo olor evaluado por los catadores en la evaluación sensorial; en el cual, con un nivel de confianza de 95%, no se encontraron diferencias significativas en el factor A: tratamiento experimental. Mientras, que en el factor B: catadores, se encontraron diferencias significativas. Lo anterior sugiere que independientemente del cultivo microbiano usado, así como del tiempo de estufaje empleado, el desarrollo de olor de los tratamientos experimentales no manifestó diferencias significativas. No obstante, los catadores revelaron diferencias en la valoración de olor de los tratamientos experimentales, debido al contraste de opiniones de cada uno de ellos.

No obstante, el interés de la investigación fue de establecer o no diferencias entre los tratamientos experimentales, razón por la cual no se consideran significativas las diferencias estadísticas que existen entre los catadores. Por lo tanto, se ha establecido que el olor de los tratamientos experimentales es percibido de igual manera por los catadores, quienes han catalogado que los chorizo (tipo Ambateño) madurados exponen olor que se

encuentra entre un rango de 3 – 4 (Perceptible – Muy perceptible) dentro de la escala hedónica utilizada, correspondientes al 36,61% y 29,46% del gusto de los catadores respectivamente, como se observa en el Gráfico C-26.

Sabor

En el Anexo B, Tabla B-10 se reporta el análisis de varianza efectuado sobre el atributo sabor evaluado por los catadores en el análisis sensorial; en el cual, con un nivel de confianza de 95%, se encontraron diferencias significativas en el factor A: tratamiento experimental. Lo cual indica, que los catadores encontraron diferencias significativas en el sabor de los diferentes tratamientos experimentales, lo cual se debió principalmente al tipo de cultivo iniciador empleado. Es decir, ya que cada cultivo iniciador estuvo conformado por microorganismos distintos, la degradación de macromoléculas y desarrollo de sabor ocurrió de manera diferente en cada uno de los tratamientos experimentales.

Por lo tanto, al realizar la prueba de múltiples rangos de Tukey HSD al 95% de confianza para sabor en los tratamientos experimentales (Tabla B-11), se observó que el tratamiento a_1b_1 (Bactoferm™ F-RM-52 con 24 horas de estufaje) es el que más difiere con los demás tratamientos experimentales, con una media de 3,86 en la escala hedónica establecida. Por lo tanto, el tratamiento antes mencionado es el que presenta una mayor predilección por parte de los catadores, por cuanto dicho tratamiento es catalogado como “Muy agradable”. Además, se ha determinado que el sabor el tratamiento a_1b_1 es catalogado como: Agradable, Muy Agradable y Bastante Agradable por parte del 35,7%, 28,57% y 28,57% de los catadores evaluados, respectivamente.

Asimismo, la valoración media del atributo sabor de todos los tratamientos experimentales por parte de los catadores se encontró en valores de 2, 3 y 4 (Poco agradable, Agradable y Muy agradable), los que corresponden respectivamente al 21,43%; 25,89% y 34,82% de la cuantía suministrada por los catadores, como se observa en el Gráfico C-27.

Aceptabilidad

En el Anexo B, Tabla B-12 se reporta el análisis de varianza efectuado sobre el atributo aceptabilidad evaluado por los catadores en la evaluación sensorial; en el cual, con un nivel de confianza de 95%, se encontraron diferencias significativas en el factor A: tratamiento experimental. En consecuencia, los catadores manifestaron diferencias significativas en la aceptabilidad de los tratamientos experimentales.

Al realizar la prueba de múltiples rangos de Tukey HSD al 95% de confianza para aceptabilidad en los tratamientos experimentales, se observó que los tratamientos: a_0b_0 (Bactoferm™ LHP con 16 horas de estufaje), a_0b_1 (Bactoferm™ LHP con 24 horas de estufaje) y a_1b_1 (Bactoferm™ F-RM-52 con 24 horas de estufaje), son los que más difieren con los demás tratamientos experimentales, con medias de 3,82; 3,94 y 3,82 respectivamente, en la escala hedónica establecida. Por lo tanto, los tratamientos antes mencionados son los que presenta una mayor predilección en la aceptabilidad por parte de los catadores, por cuanto dichos tratamientos son catalogados como “Muy aceptable”. Igualmente, se ha determinado que la aceptabilidad del tratamiento a_1b_1 es catalogado como: Aceptable, Muy aceptable y Bastante aceptable por parte del 28,57%, 21,43% y 35,71% de los catadores evaluados, respectivamente.

De igual manera, la valoración del atributo aceptabilidad de los tratamientos experimentales por parte de los catadores se encontró en valores de 3 y 4 (Aceptable y Muy aceptable), que corresponde respectivamente al 28,57% y 34,82% de la apreciación suministrada por los catadores, se observa en el Gráfico C-28.

Análisis en el mejor tratamiento

El mejor tratamiento experimental se ha determinado en función al descenso de pH a las 24 horas de procesamiento; por lo tanto, el tratamiento a_1b_1 : Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*) con 24 horas de estufaje, se ha establecido como el mejor.

La decisión fue tomada en función al pH por cuanto es un parámetro importante en la elaboración de embutidos madurados, debido a que con un descenso de pH por debajo de 5,3 durante las 24 – 48 horas posteriores a la fermentación, se inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos que pudieran desarrollarse en la mezcla cárnica. Además, con un pH menor a 5,3 la carne alcanza su punto isoeléctrico, lo que permitió la formación de una emulsión cárnica que adhirió los componentes entre sí, sin que estos se disgreguen.

Asimismo, se indica que el tratamiento a₁b₁: Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*) con 24 horas de estufaje por parte de los catadores fue asignado en los atributos sabor y aceptabilidad como: Muy agradable y Muy aceptable, respectivamente.

Por lo tanto, al mejor tratamiento se aplicaron ensayos de rebanabilidad, análisis proximal, análisis microbiológico, cinética de crecimiento de los microorganismos iniciadores, tiempo de vida útil, rendimiento y estimación económica.

Rebanabilidad

En el Anexo A, Tabla A-18 se reportan los resultados del ensayo de rebanabilidad del tratamiento a₁b₁: Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*) con 24 horas de estufaje, donde se establece que el porcentaje de rebanabilidad es del 91,17%.

El porcentaje citado anteriormente, indica la cantidad de lonchas de 5 mm de buena calidad que se obtuvieron al analizarse el ensayo de rebanabilidad del tratamiento experimental. Los defectos en el loncheado se atribuyen a los extremos del producto elaborado, debido a que en dichas partes no existió una adecuada distribución de la mezcla cárnica al momento del amarrado del producto.

No obstante, se considera que la rebanabilidad del 91,17% es un valor alto; debido a que se maximiza el aprovechamiento de producto final,

cuando éste es presentado mediante lonchas de 5 mm de espesor. Con una merma de 8,83% debido principalmente al defecto de corte de las lonchas.

Análisis proximal

En el Anexo A, Tabla A-15 se reporta el análisis proximal efectuado en el tratamiento a₁b₁: Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*) con 24 horas de estufaje. De lo cual, se estableció que el valor de proteína de 14,10% para el producto elaborado, cumple con el requisito mínimo de proteína animal para embutidos madurados que es del 14%, de acuerdo a la Norma INEN NTE 1 338:2010.

Asimismo, se indica que el valor determinado de humedad de 35,98% estableció al producto como: embutido de maduración corta (1 a 4 semanas), con un contenido de humedad comprendido entre 30% – 40% y actividad de agua entre 0,92 – 0,94 (Roca e Incze, 1990).

Por otro lado, el contenido de grasa presentó un valor de 27,47% que aproximadamente equivale a una tercera parte del chorizo (tipo Ambateño) madurado.

En cuanto al contenido de cenizas, se ha determinado un valor de 5,95% debido principalmente a cloruro de sodio añadido a la mezcla, y sales de cura del tratamiento experimental, los cuales se han concentrado como resultado del desecado del producto.

En lo que respecta al contenido de carbohidratos, se indica que el valor de 16,50% correspondió a la presencia de hidratos de carbono no fermentables, fibra dietética. No obstante, se destaca la ausencia de almidón, al no haberse añadido en la formulación inicial del tratamiento experimental.

Análisis microbiológico

La determinación de la calidad microbiológica de un alimento es importante, debido a que éste debe cumplir con normas vigentes que

garanticen la inocuidad y seguridad alimentaria para que éste pueda ser comercializado al consumidor.

Al mejor tratamiento experimental se determinó la calidad microbiológica, mediante el ensayo de Coliformes totales/*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens* a los 30 días de elaboración, como se observa en el Anexo A, Tabla A-14.

Coliformes / *Escherichia coli*

El análisis de coliformes totales / *Escherichia coli* en un producto cárnico es importante, dado que es un importante indicador del uso de materia prima de mala calidad durante el proceso de elaboración, así como la contaminación de las etapas de proceso con materia de origen fecal, la cual pudiera suscitarse por la inadecuada manipulación de los utensilios y materiales empleados en el proceso de elaboración de un producto cárnico.

En el Anexo A, Tabla A-14 se reporta el resultado del análisis de coliformes totales / *Escherichia coli* del tratamiento a₁b₁: Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*) con 24 horas de estufaje; el cual indicó ausencia de los mencionados microorganismos, expresado como un recuento < 10 NMP/g, aplicado en las diluciones 10⁻¹, 10⁻² y 10⁻³.

Salmonella

La presencia de *Salmonella* sp. en carne y productos derivados es inaceptable, según lo establece la Norma NTE INEN 1 338:2010, debido a que su presencia, proliferación o supervivencia en dichos productos se define como peligro por la capacidad que tiene el agente de producir enfermedad en el consumidor.

En el Anexo A, Tabla A-14 se reporta el resultado de análisis de *Salmonella* en el tratamiento a₁b₁: Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*) con 24 horas de estufaje; mismo que comprobó la ausencia del éste microorganismo. La determinación se efectuó en la dilución 10⁻¹.

Por lo tanto, se estableció que el producto elaborado presenta inocuidad para su comercialización y consumo, sin que afecte la salud del consumidor final.

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus se encuentra frecuentemente en la carne fresca y en embutidos fermentados, pero generalmente en niveles bastante bajos (Lücke *et al.*, 1998). *Staphylococcus aureus* presenta gran variedad de enzimas y toxinas que contribuyen a su patogenicidad y un grupo de toxinas, las enterotoxinas, causan intoxicaciones alimentarias (Balaban y Rasooly, 2000).

En el Anexo A, Tabla A-14 se reporta el resultado de la ausencia del análisis de *Staphylococcus aureus* en el tratamiento a₁b₁: Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*) con 24 horas de estufaje, a los 30 días de procesamiento. Dicho análisis, se efectuó en medio Manitol Sal Rojo Congo (Fotografía D-7) medio selectivo y diferencial para especies de estafilococos, en la dilución 10⁻¹.

De tal manera, se estableció que el desarrollo de *Staphylococcus aureus* no tuvo lugar durante el tiempo de fermentación y maduración del producto elaborado; con lo cual se garantiza la calidad e inocuidad del mismo, siendo así apto para el consumo humano.

Clostridium perfringens

El análisis de *Clostridium perfringens* en un producto cárnico madurado, es importante debido al gran riesgo que constituye ésta especie microbiana en la producción de toxinas que pueden causar enfermedades como la enteritis necrótica o la gangrena gaseosa. Por tratarse de un microorganismo anaerobio estricto, se evidencia su desarrollo por la formación de gas en el producto cárnico, con la degradación de la emulsión.

De tal manera, en el Anexo A, Tabla A-14 se detalla el resultado del análisis de *Clostridium perfringens* en el tratamiento a₁b₁: Bactoferm™

F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*) con 24 horas de estufaje, a los 30 días de procesamiento.

La determinación se efectuó en el medio agar Sulfito-polimixina-sulfadiazina (SPS, Merck), que es un medio selectivo para clostridios sulfito-reductores, utilizado para el aislamiento y detección de *Clostridium botulinum* y *Clostridium perfringens* en alimentos y otros materiales. De tal manera, se verificó la ausencia de desarrollo de *Clostridium perfringens* en la dilución 10^{-1} , lo cual permite confirmar la calidad e inocuidad del producto cárnico evaluado.

8.2.3. Tiempo de vida útil

Los embutidos secos-fermentados dependen no solamente en la fermentación para alcanzar la textura y sabor deseados, pero durante sus largos períodos de maduración otros procesos tanto bioquímicos y físicos ocurren. Procesos prolongados de secado y maduración llevan a que el producto presente un contenido bajo de humedad. El contenido final de humedad de embutidos secos-fermentados es siempre menor al 35%, siendo en algunos casos aún menores que 30%. Esto corresponde a una actividad de agua de 0,90 y menor, lo que hace que el producto sea auto-estable. Bajo condiciones climáticas moderadas y almacenamiento (por ejemplo 20°C y 70-75% de humedad relativa), los productos tienen una prolongada vida útil de cerca de un año (HEINZ & HAUTZINGER, 2007).

La determinación del tiempo de vida útil del tratamiento a₁b₁: Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*) con 24 horas de estufaje, según la norma NTE INEN 1 338:2010, se estableció mediante el recuento microbiano de *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens*.

Sin embargo, se menciona que el recuento de los indicados microorganismos en el mejor tratamiento experimental evidenció la ausencia de estos en el producto elaborado, a los 30 días de proceso.

Por lo tanto, teóricamente se considera que el chorizo (tipo Ambateño) madurado por tratarse de un embutido de maduración corta (1 a 4 semanas), con un contenido de humedad comprendido entre 30% – 40% y actividad de agua entre 0,92 – 0,94 (Roca e Incze, 1990); podría presentar un tiempo de vida útil de 3 a 4 meses a temperatura ambiente. Dicho tiempo dependería de las condiciones a las cuales se exponga el producto durante el almacenamiento.

Lo anterior, se sustenta en el hecho que un salami, el cual corresponde a un embutido de maduración larga (12 a 14 semanas), con un contenido de humedad de 20% – 30% y actividad de agua entre 0,85 – 0,86; presenta un tiempo de vida útil comprendido entre 5 a 6 meses. De tal manera, el chorizo (tipo Ambateño) madurado, al presentar un menor tiempo de maduración manifiesta un menor tiempo de vida útil que un salami.

No obstante, por la necesidad de establecer un tiempo de vida útil para el mejor tratamiento, por tratarse de un producto alimenticio, se lo realizó mediante el parámetro pérdida de peso. Debido a que, si bien la pérdida de peso del producto durante el secado es deseable para el desarrollo de las propiedades físicas, químicas y organolépticas del producto; un excesivo secado puede llevar a mermas considerables en la rentabilidad del producto.

Así, se ha considerado la sección en la cual la pérdida de peso del mejor tratamiento presentó una tendencia lineal (Anexo C, Gráfico C-29), obteniéndose el siguiente modelo matemático que define la cinética de pérdida de peso de chorizo (tipo Ambateño) madurado:

$$\text{Pérdida de peso [\%]} = 0,1409(\text{Tiempo [h]}) + 14,857$$

Con una factor de correlación $R^2 = 0,9994$, que corresponde a una reacción de orden cero. De tal manera, se puede despejar el tiempo que tardará el tratamiento a_1b_1 en presentar una pérdida de peso referencial.

Por lo tanto, se ha tomado un rango de pérdida de peso del producto de entre el 50 y 60 %, tomándose como referencia el límite máximo, en el que la

rentabilidad se ve reducida considerablemente, para el cálculo de vida útil. Con lo cual se obtuvo el siguiente resultado:

$$\text{Tiempo [h]} = \frac{\text{Pérdida de peso [\%]} - 14,857}{0,1409}$$

$$\text{Tiempo [h]} = \frac{60 - 14,857}{0,1409}$$

$$\text{Tiempo [h]} = 320,39$$

$$\text{Tiempo [días]} = 13,34$$

De tal manera, mediante la evaluación de la pérdida de peso por evaporación de agua del producto se ha establecido un tiempo de vida útil de 13,34 días a temperatura ambiente. Sin embargo, se indica que el producto una vez alcanzado el 35% de pérdida de peso se retira de la cámara de maduración para su empaque y almacenamiento; se puede prolongar el tiempo de vida útil del producto mediante su empaque en vacío. De tal manera, que se conserven las características físicas, químicas y sensoriales, a su vez que prevenga el secado excesivo del producto.

8.2.4. Cinética de crecimiento microbiano del tratamiento a₁b₁: Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*) – 24 horas estufaje

Las características microbiológicas y la composición química de la carne la convierten en un excelente sustrato para los microorganismos (Hirooka *et al.*, 1982). Desde un punto de vista microbiológico, la propiedad más importante que presenta la carne es un elevado contenido en agua que se traduce en una actividad de agua (a_w) de aproximadamente 0,99, lo que permite el crecimiento de la mayor parte de microorganismos, tanto deseables (aquellos responsables de la maduración del producto), como indeseables (aquellos responsables del deterioro y pérdida de calidad del producto).

Por tal razón, se ha determinado la cinética de crecimiento de los microorganismos presentes en el cultivo iniciador Bactoferm™ F-RM-52: *Lactobacillus curvatus* y *Staphylococcus carnosus*. Dicho análisis se determinó durante el tiempo de fermentación y maduración del mejor tratamiento experimental.

La cinética de crecimiento o velocidad de crecimiento consiste en el cambio de células o masa celular experimentado por unidad de tiempo. Durante el ciclo de división celular, todos los componentes estructurales de la célula se duplican. De tal manera, el intervalo de formación de dos células a partir de una supone una generación (n), y el tiempo transcurrido para que esto ocurra se llama tiempo de generación (g). (Brock, 2004).

Un modelo de incremento de una población microbiana, en el cual cada período fijo de tiempo se duplica el número de células, se denomina crecimiento exponencial. Por lo tanto, durante el crecimiento exponencial se puede determinar la velocidad de crecimiento y el número de generaciones ocurridas en un microorganismo particular, los cuales dependen del medio de cultivo utilizado y de las condiciones de incubación aplicadas. (Brock, 2004).

Por otro lado, otro índice de la velocidad de crecimiento es la constante de velocidad de crecimiento (k), la cual es una medida del número de generaciones (n) que ocurre por unidad de tiempo en un cultivo exponencial.

Consecuentemente, se establece que los microorganismos presentes en el cultivo iniciador Bactoferm™ F-RM-52 fueron responsables: del descenso de pH, aumento de acidez y desarrollo de las características sensoriales en el chorizo (tipo Ambateño) madurado.

Staphylococcus carnosus

Staphylococcus carnosus pertenece a un grupo de microorganismos conocidos como: cocos gram-positivos catalasa-positivos; además, es una bacteria coagulasa negativo. Los cuales se caracterizan principalmente por: la actividad catalasa, que degrada los peróxidos; la actividad nitrato y nitrito-

reductasa, convirtiendo los nitratos a nitritos y éstos a óxido nítrico; y la actividad proteolítica y lipolítica. (Juárez, 2005)

Por lo tanto, se determinó el crecimiento de *Staphylococcus carnosus* en el producto elaborado mediante la técnica de siembra en placa en medio de cultivo agar Baird Parker, el cual es un medio selectivo y diferencial para especies de estafilococos.

En el Anexo A, Tabla A-13 y A-14 se reporta el conteo de colonias y de unidades formadoras de colonia [ufc/g] de *Staphylococcus carnosus* desarrolladas durante el tiempo de fermentación y maduración del producto.

Además, en el Anexo C, Gráficos C-30 y C-31 se encuentra reportado el crecimiento de *Staphylococcus carnosus*, en escala normal y semilogarítmica. No obstante, el crecimiento analizado correspondió solamente a la etapa de fermentación y maduración del producto, donde se observa que luego de las primeras 24 horas de proceso el crecimiento microbiano tendió a estabilizarse en el tiempo.

Por otro lado, en el Anexo C, Gráfico C-32 se representa la etapa de crecimiento exponencial de *Staphylococcus carnosus*, la cual manifestó un coeficiente de correlación de 0,9958, cuyo modelo matemático equivale a:

$$\log (\text{ufc/g } \textit{Staphylococcus carnosus}) = 0,0177*(h) + 5,0659$$

Lactobacillus curvatus

Lactobacillus curvatus pertenece a un grupo de bacterias denominadas: bacterias del ácido láctico (BAL). Las cuales son el grupo bacteriano de mayor importancia en el proceso de elaboración de los embutidos fermentados. De los cuales, especialmente el género *Lactobacillus*, son los responsables de la producción de ácido láctico durante la fermentación, provocando así una disminución del pH. Las BAL se desarrollan rápidamente durante el proceso fermentativo y mantienen los niveles de población desarrollados hasta el final de la maduración (Hugas *et al.*, 1993).

De tal manera, se determinó el crecimiento de *Lactobacillus curvatus* en el producto elaborado mediante la técnica de siembra en placa en medio de cultivo agar Rogosa Man, el cual es un medio selectivo para especies de lactobacilos.

En el Anexo A, Tabla A-13 y A-14 se indica el recuento de colonias y de unidades formadoras de colonia [ufc/g] de *Lactobacillus curvatus* desarrolladas durante el tiempo de fermentación y maduración del producto.

Asimismo, en el Anexo C, Gráficos C-34 y C-35 se ha reportado el crecimiento de *Lactobacillus curvatus* durante la fermentación y maduración de chorizo (tipo Ambateño), en escala normal y semilogarítmica, respectivamente. Indicándose, que el desarrollo del mencionado microorganismo tendió a estabilizarse luego de las 51 horas de proceso.

Además, en el Anexo C, Gráfico C-36 está representada la etapa de crecimiento exponencial de *Lactobacillus curvatus*, la cual manifestó un coeficiente de correlación de 0,9863, y cuyo modelo matemático corresponde a:

$$\log (\text{ufc/g } Lactobacillus \text{ curvatus}) = 0,0501*(h) + 3,7606$$

Determinación del número de generaciones (n)

Para la determinación del número de generaciones se aplicó la siguiente ecuación, que denota la progresión geométrica existente en la etapa de crecimiento exponencial (Brock, 2002):

$$N = N_0 2^n$$

Donde:

N = número final de células

N₀ = número inicial de células

n = número de generaciones

Despejando, se tiene:

$$N = N_0 2^n$$

$$\log N = \log N_0 + n \log 2$$

$$\log N - \log N_0 = n \log 2$$

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2} = \frac{\log N - \log N_0}{0,301}$$

$$n = 3,3 (\log N - \log N_0)$$

Staphylococcus carnosus

Por lo tanto, tomando los datos del Anexo A, Tabla A-17 de la zona de crecimiento exponencial de *Staphylococcus carnosus* se obtuvo:

$$n = 3,3 [\log (2,92 \times 10^5) - \log (1,20 \times 10^5)]$$

$$n = 3,3 (0,3862)$$

$$n = 1,27$$

Lo anterior indica que han ocurrido 1,27 generaciones de *Staphylococcus carnosus* durante el tiempo de su respectivo crecimiento exponencial en la mezcla cárnica del tratamiento experimental. Es decir, durante las primeras 24 horas de fermentación.

Lactobacillus curvatus

Asimismo, tomando los datos del Anexo A, Tabla A-17 de la zona de crecimiento exponencial de *Lactobacillus curvatus* se obtuvo:

$$n = 3,3 [\log (4,60 \times 10^5) - \log (1,31 \times 10^4)]$$

$$n = 3,3 (1,5455)$$

$$n = 5,10$$

Lo anterior indica que han ocurrido 5,10 generaciones de *Lactobacillus curvatus* durante el tiempo de su respectivo crecimiento exponencial en la mezcla cárnica del tratamiento experimental. Lo cual correspondió a las 51 horas posteriores al procesamiento.

Con los resultados obtenidos, se ha observado que *Lactobacillus curvatus* presentó un mayor desarrollo que *Staphylococcus carnosus*, debido a que la cantidad de generaciones ocurridas durante la etapa de crecimiento exponencial fue respectivamente de 5,1 y 1,27.

Determinación del tiempo de generación (g)

Para la determinación del tiempo de generación (tiempo en el cual la población microbiana se duplicó), fue necesario graficar la etapa de crecimiento exponencial en función al tiempo, en escala semilogarítmica. De donde, se puede aplicar la siguiente ecuación (Brock, 2002):

$$m = \frac{0,301}{g}$$

Dónde:

g = tiempo de generación

m = pendiente de la curva de crecimiento exponencial

$$g = \frac{0,301}{m}$$

Obteniéndose los siguientes resultados:

Staphylococcus carnosus

En el Anexo C, Gráfico C-32 se reporta la etapa de crecimiento exponencial de *Staphylococcus carnosus*, determinándose que la pendiente de la curva fue de 0,0177. Por lo tanto, su tiempo de generación es:

$$g = \frac{0,301}{0,0177}$$

$$g = 17,00 \text{ horas}$$

Lactobacillus curvatus

En el Anexo C, Gráfico C-36 se reporta la etapa de crecimiento exponencial de *Lactobacillus curvatus*, determinándose que la pendiente de la curva fue de 0,0501. Por lo cual, su tiempo de generación es:

$$g = \frac{0,301}{0,0501}$$

$$g = 6,01 \text{ horas}$$

Por lo tanto, se estableció que la población de *Lactobacillus curvatus* tarda menos tiempo en duplicarse en chorizo (tipo Ambateño) madurado, que la población de *Staphylococcus carnosus*, debido a que sus tiempos de generación son respectivamente: 6,01 horas y 17 horas.

Determinación de la constante de velocidad crecimiento (k)

Para la determinación de la constante de velocidad de crecimiento, se ha utilizado el valor de tiempo de generación (g), aplicando la siguiente ecuación (Brock, 2002):

$$k = \frac{\ln 2}{g}$$

Dónde:

k = constante de velocidad de crecimiento (hora⁻¹)

g = tiempo de generación (hora)

Staphylococcus carnosus

$$k = \frac{\ln 2}{17 \text{ horas}}$$

$$k = 0,041 \text{ hora}^{-1}$$

Lactobacillus curvatus

$$k = \frac{\ln 2}{6,01 \text{ horas}}$$

$$k = 0,115 \text{ hora}^{-1}$$

Así, se ha determinado que la cantidad de generaciones desarrolladas en chorizo (tipo Ambateño) madurado por *Lactobacillus curvatus* es mayor que *Staphylococcus carnosus*, debido a que sus constantes de velocidad son respectivamente: 0,041 hora⁻¹ y 0,115 hora⁻¹.

Por lo tanto, se ha determinado que el desarrollo de *Lactobacillus curvatus* en chorizo (tipo Ambateño) madurado, es más pronunciado que el desarrollo de *Staphylococcus carnosus* durante el tiempo de fermentación y maduración del tratamiento experimental.

De tal manera, el pronunciado crecimiento de *Lactobacillus curvatus* estuvo directamente relacionado con el aumento de acidez y descenso de pH del tratamiento experimental. Con lo cual se comprueba su acción como bacteria ácido láctica (BAL), ya que *Staphylococcus carnosus* presentó su efecto sobre las propiedades organolépticas del tratamiento experimental tales como: sabor, olor y color.

8.2.5. Rendimiento de chorizo (tipo Ambateño) madurado con Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*) – 24 horas estufaje

Para obtener el rendimiento del tratamiento experimental, se utilizó los balances de materiales del Anexo H, Diagrama H-1. En el cual, se comprueba que la mayor pérdida de peso del producto se registra durante la etapa del secado. Ésta etapa, fue importante por la reducción de actividad de agua del tratamiento experimental, así como el desarrollo de la consistencia característica de un producto cárnico madurado.

Por lo tanto, se reporta que el rendimiento de chorizo (tipo Ambateño) madurado utilizando: Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*) y 24 horas de estufaje es del 67,42%. Éste rendimiento, resulta considerablemente alto considerándose que el producto corresponde a un embutido madurado.

8.2.6. Estimación económica

Con el fin de establecer el costo de la tecnología aplicada en el trabajo de investigación, se ha realizado la estimación del costo de producción de chorizo (tipo Ambateño) madurado para una parada de 8 kilogramos. Para lo cual se han considerado: gastos directos e indirectos, equipos y utensilios, suministros y salarios de operarios.

De tal manera, en el Anexo G, Tablas G-1, G-2, G-3, G-4 y G-5 se reporta el análisis económico del tratamiento a₁b₁: Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*) con 24 horas de estufaje; el cual establece un valor de 3,09 USD.

Consecuentemente, se menciona que el valor indicado anteriormente corresponde a 250 gramos de producto terminado; mismo que al contrastarse con el valor de venta al público de salami – un producto cárnico madurado presente en el mercado nacional – resulta menor. El valor de 200 gramos de salami de la empresa “Don Diego” en el mercado nacional se encuentra en un valor de 3,15 USD.

Por lo tanto, la tecnología de elaboración de chorizo (tipo Ambateño) madurado con el uso de Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*) con 24 horas de estufaje es rentable de aplicarse.

8.3. VERIFICACIÓN DE LA HIPÓTESIS

Se ha rechazado la hipótesis nula que señala que el uso de Bactoferm™ LHP (*Pediococcus acidilactici* & *Pediococcus pentosaceus*), Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*), Bactoferm™ F-LC (*Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus* and *Staphylococcus xylosus*) y Cultivo lácteo SLB 95₃ (*Lactobacillus bulgaricus* & *Streptococcus thermophilus*), y el tiempo de estufaje no influyen significativamente en la elaboración de chorizo (tipo Ambateño) madurado. La discusión presentada en cada una de las secciones precedentes da cuenta de la realidad para los distintos parámetros evaluados.

En consecuencia, se acepta la hipótesis alternativa, $T \neq 0$, es decir, que el uso de Bactoferm™ LHP (*Pediococcus acidilactici* & *Pediococcus pentosaceus*), Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*), Bactoferm™ F-LC (*Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus* and *Staphylococcus xylosus*) y Cultivo lácteo SLB 95₃ (*Lactobacillus bulgaricus* & *Streptococcus thermophilus*), y el tiempo de estufaje influyen significativamente en la elaboración de chorizo (tipo Ambateño) madurado.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

13.1. CONCLUSIONES

- Se evaluó el efecto del uso de Bactoferm™ LHP (*Pediococcus acidilactici* & *Pediococcus pentosaceus*), Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*) y Bactoferm™ F-LC (*Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus* and *Staphylococcus xylosus*) en la elaboración de chorizo (tipo Ambateño) madurado, los cuales influyeron significativamente en el desarrollo de propiedades físicas: pérdida de peso, hasta un máximo de 34,95%, y desarrollo de consistencia; y propiedades químicas: reducción de pH, de un valor inicial entre 6,99 – 6,71 hasta un valor de 5,13 – 5,78 a las 24 horas de proceso, y de 5,16 – 5,98 al término del secado; e incremento de acidez titulable, de un valor inicial de 0,495% – 0,575%, hasta un valor de 1,78% – 2,215% al término del proceso de secado, de la mezcla cárnica adecuadamente condimentada; donde dichos cambios fueron llevados a cabo durante los procesos de estufaje (24 horas a 35° C), fermentación y secado. De igual manera, el uso de los cultivos iniciadores afectó las características sensoriales del producto, dando como resultado el notable mejoramiento organoléptico. Por otro lado, se verificó que los cultivos iniciadores también ejercieron un efecto inhibitor sinérgico junto con las sales de cura y la baja actividad de agua del producto sobre la microflora no deseada en el producto madurado: coliformes totales/*Escherichia coli*,

Salmonella, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens*, debido a la ausencia de la misma al efectuarse el respectivo análisis microbiológico.

- Se determinó los cambios de pH, acidez titulable y pérdida de peso de chorizo (tipo Ambateño) madurado ocurridos durante el proceso de estufaje, fermentación y secado, de lo cual se estableció que el empleo de los cultivos iniciadores Bactoferm™ LHP, Bactoferm™ F-RM-52, Bactoferm™ F-LC y cultivo lácteo SLB 95₃ influyó sobre los cambios. De tal manera, el pH de los tratamientos experimentales registró un descenso significativo desde 6,71 – 6,99 a valores que oscilaron entre 5,13 a 5,78 durante las primeras 24 horas de estufaje; con lo cual se alcanzó un pH de 5,3, necesario para la inhibición de microflora contaminante en la mayoría de los tratamientos analizados. Consecuentemente con el descenso de pH, se comprobó el aumento de la acidez titulable de los tratamientos experimentales, lo cual ocurrió como resultado de la transformación de los carbohidratos fermentables – glucosa – en ácido láctico por parte de los cultivos iniciadores, cuyos valores al término de la fermentación oscilaron entre 1,78% a 2,22%; igualmente, el aumento de acidez influyó en el desarrollo de las propiedades sensoriales de los tratamientos experimentales. Finalmente, la pérdida de peso, debida a la evaporación de agua del producto, se indica que fue muy pronunciada durante las 24 horas de estufaje, con una tendencia a aumentar en el tiempo que se mantuvo constante hasta el término del secado, donde manifestó valores entre 26,08% a 33,85%; como resultado del secado el producto adquirió una consistencia de los embutidos madurados, así como la reducción de actividad de agua y favoreciendo su conservación en el tiempo.
- Se analizaron estadísticamente las características organolépticas de chorizo (tipo Ambateño) madurado tales como: color, olor, sabor y aceptabilidad mediante la aplicación de pruebas de análisis sensorial con un diseño de bloques incompletos. Estableciéndose que los catadores al 95% de confianza no encontraron diferencias significativas en las características color y olor entre los tratamientos experimentales; lo cual,

indica que la apreciación de los parámetros se encuentra con valores de 3 a 4 dentro de la escala hedónica utilizada, es decir, que el color es percibido entre Intenso a Muy Intenso y el olor entre Perceptible a Muy Perceptible, en los 8 tratamientos experimentales. No obstante, en cuanto a las características sabor y aceptabilidad, los catadores al 95% de confianza encontraron diferencias significativas; donde, se destaca que el tratamiento a₁b₁ (Bactoferm™ F-RM-52 con 24 horas de estufaje), fue el que mayor preferencia presentó entre los catadores evaluados. Razón por la cual, el tratamiento correspondió como el mejor entre los tratamientos que fueron sujetos de estudio experimental.

- Se ha establecido que la calidad microbiológica del tratamiento a₁b₁ (Bactoferm™ F-RM-52 con 24 horas de estufaje) es muy buena; debido a que, como se reporta en el Anexo A, Tabla A-14, los resultados de los principales microorganismos contaminantes y patógenos tales como: coliformes totales / *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus* de los análisis obtenidos, se ha establecido su ausencia en el tratamiento experimental a los 30 días de procesamiento en las diluciones 10⁻¹, 10⁻² y 10⁻³. Indicándose que en el caso de *Salmonella* el recuento fue ausencia de desarrollo microbiano, mientras que en coliformes / *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus* el resultado manifestó un conteo <10 ufc/g. De tal manera, se establece que, tanto la materia prima utilizada, así como cada una de las etapas de producción fueron realizadas en condiciones de buena asepsia, dando como resultado la obtención de un producto cárnico madurado de buena calidad microbiológica.
- Consecuentemente con los resultados de calidad microbiológica del tratamiento a₁b₁ (Bactoferm™ F-RM-52 con 24 horas de estufaje), se buscó calcular el tiempo de vida útil en condiciones aceleradas en función a los recuentos de *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens*, los cuales son principales indicadores del tiempo de vida útil de embutidos madurados; no obstante, la ausencia de crecimiento de estos microorganismos en la dilución 10⁻¹(recuento <10 ufc/g), no se ha

podido aplicar cálculos de tiempo de vida útil en función al desarrollo microbiano. Empero, de acuerdo a lo citado por Heinz & Hautzinger (2007), que “*un embutido madurado con una actividad de agua menor a 0,90 presenta características de auto-estabilidad; además, que bajo condiciones climáticas moderadas y almacenamiento (por ejemplo 20°C y 70-75% de humedad relativa), los embutidos madurados tienen una prolongada vida útil de cerca de un año*”; se concluye que el tratamiento a₁b₁ por presentar un contenido de humedad de 35,98%, ausencia de microorganismos patógenos, bajo pH (5,21) al término del secado, reducida actividad de agua, y empleo de cultivos iniciadores con conocida capacidad inhibidora de microflora patógena, podría presentar un tiempo de vida útil de alrededor de 3 – 4 meses.

No obstante, por tratarse de un producto alimenticio, fue necesario estimar el tiempo de vida útil del producto, para lo cual se consideró el parámetro pérdida de peso; tomándose como límites máximos 50 – 60% de pérdida de peso. Consecuentemente, con la aplicación del modelo matemático de orden cero: Pérdida de peso [%] = 0,1409(Tiempo [h]) + 14,857, con un coeficiente de correlación de 0,9994, que describe la cinética de pérdida de peso del tratamiento a₁b₁, se estableció un tiempo de vida útil de 13,34% a temperatura ambiente.

- Se ha determinado la cinética de crecimiento de los microorganismos iniciadores presentes en el tratamiento a₁b₁: Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*) con 24 horas de estufaje. Los cuales, durante la etapa de crecimiento exponencial presentaron los siguientes valores de número de generaciones: 1,70 y 5,10 para *Staphylococcus carnosus* y *Lactobacillus curvatus*, respectivamente; es decir, que *Lactobacillus curvatus* manifestó una mayor multiplicación de su población microbiana durante el tiempo de fermentación y secado que la población de *Staphylococcus carnosus*, lo cual explica el descenso de pH experimentado en el tratamiento experimental, así como el aumento de acidez por la producción de ácido láctico. Por otro lado, se destaca que *Lactobacillus curvatus* presentó un

tiempo de generación de 6,01 horas mientras que *Staphylococcus carnosus* un tiempo de generación de 17 horas, lo cual establece que la población de *Lactobacillus curvatus* se duplicó más rápidamente en la mezcla cárnica durante la etapa de crecimiento exponencial. Por lo tanto, los resultados obtenidos permiten manifestar que la capacidad de adaptación de *Lactobacillus curvatus* en un chorizo (tipo Ambateño) madurado es muy grande, por cuanto influye directamente en la acidificación del producto cárnico. No obstante, si bien *Staphylococcus carnosus* no se reproduce tan rápidamente en el producto cárnico como *Lactobacillus curvatus*, su desarrollo influye en el desarrollo de características sensoriales propias de éste tipo de productos cárnicos.

- Seguidamente se ha propuesto que se elabore chorizo (tipo Ambateño) madurado utilizando como cultivo iniciador Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* y *Staphylococcus carnosus*) con 24 horas de estufaje), en vista de que el proceso de fermentación y maduración dieron como resultado el descenso de pH de la mezcla cárnica cruda a un valor de 5,13 a las 24 horas de proceso, con lo cual se garantizó la estabilidad tecnológica del tratamiento experimental. Además, que también se favoreció el desarrollo de las características sensoriales del producto, ya que conforme a los resultados de análisis de varianza el producto presenta preferencia en cuanto a los parámetros características sabor y aceptabilidad por parte de los catadores evaluados.
- Además, se concluye que un estufaje de 35 °C durante 24 horas influyó significativamente en la elaboración de chorizo (tipo Ambateño) madurado; debido a que, tanto las propiedades físico-químicas, así como las propiedades organolépticas del producto se desarrollaron de mejor manera. La temperatura y tiempo de estufaje establecidos, estimularon el adecuado desarrollo de los microorganismos iniciadores en la mezcla cárnica de acuerdo a sus hojas técnicas (Anexo H), verificado en el descenso de pH e incremento de acidez titulable de los tratamientos experimentales luego de 24 horas de inoculación del producto.

13.2. RECOMENDACIONES

- Se ha utilizado tripa natural de cerdo para el embutido de chorizo (tipo Ambateño) madurado, identificándose que dicho empaque presentó alta permeabilidad a gases y vapor de agua, con un consiguiente secado que ocurrió de forma rápida. Por lo cual, se recomienda se realice un estudio con la formulación del mejor tratamiento y el uso de diferente tipo de empaque: tripa colagénica, tripa celulósica o papel pergamino, con diferente calibre; de tal manera que se pueda establecer el tipo de empaque que sea el más adecuado para la maduración de chorizo (tipo Ambateño), de tal manera que el secado ocurra de manera controlada a fin de favorecer el máximo desarrollo de sus propiedades tanto físico químicas como organolépticas.
- Por otro lado, dado que se ha utilizado dextrosa como sustrato para la fermentación ácido láctica del producto por parte de los microorganismos iniciadores; se recomienda se analice si la sustitución de dextrosa por otros azúcares fermentables tales como: fructosa, sacarosa o azúcar invertido da como resultado diferencias en la obtención de chorizo (tipo Ambateño) madurado.
- Se recomienda se estudie el efecto individual que los microorganismos presentes el cultivo iniciador Bactoferm™ F-RM-52: *Lactobacillus curvatus* y *Staphylococcus carnosus* ejercen en el producto elaborado, de tal manera que se puedan establecer sus condiciones óptimas de crecimiento. Además, se pueda establecer la capacidad antimicrobiana ejercida por *Lactobacillus curvatus* contra microflora contaminante por su producción de bacteriocinas en el producto elaborado.
- En la elaboración de productos cárnicos madurados el uso de nitritos de sodio y potasio es una práctica extendida, sobre todo para la inhibición de *Clostridium botulinum*; estudios sugieren que sustancias como eugenol y aldehído cinámico, presentes en los aceites esenciales de clavo de olor y canela (las cuales son especias utilizadas en la formulación de ciertos embutidos), presentan actividad antimicrobiana

contra *Clostridium botulinum*, sin afectar el desarrollo de microorganismos iniciadores, ni al curado de la carne (Nochemfood, 2009). En consecuencia, se recomienda se estudie el efecto de la sustitución parcial de nitrito de sodio y potasio con aceites esenciales de especias como clavo de olor y canela en la elaboración del mejor tratamiento de chorizo (tipo Ambateño) madurado.

- Además, se recomienda se vigile adecuadamente la humedad relativa de la cámara de maduración, para que el proceso de maduración y posterior secado del producto se lleve a cabo de forma controlada, de manera que se favorezcan las reacciones químicas, bioquímicas y el madurado del chorizo (tipo Ambateño).
- Finalmente, se recomienda se realice un estudio de factibilidad de la implementación de la tecnología desarrollada en el trabajo de investigación, para la producción comercial del mejor tratamiento de chorizo (tipo Ambateño) madurado.

realizando en su mayor parte de forma empírica y basándose únicamente en la experiencia.

Gran parte de las empresas productoras de embutidos en Ecuador, no cuentan con profesionales de la rama que se encarguen de la supervisión y control del proceso productivo, de tal manera, surge la imperativa necesidad de elaborar productos cárnicos de buena calidad. La buena calidad se entiende desde la utilización de materia prima de calidad, pasando por cada una de las etapas de producción, hasta su posterior distribución y consumo; donde, a su vez se optimicen los recursos de manera adecuada.

Actualmente, en la elaboración de embutidos crudos-curados el empleo de materias primas de calidad es un criterio netamente comercial, debido a que es considerado como la elevación del costo de producción. De ahí que, a nivel industrial tienden a optar por alterar los ingredientes básicos de elaboración de un embutido con la finalidad de reducir los costos de producción, y de ésta manera obtener mayores réditos económicos.

En consecuencia, es provechoso el desarrollo de propuestas tecnológicas que permitan resolver la tendencia marcada por la necesidad de obtención de mayores réditos económicos, por una cultura de fabricación de productos cárnicos de calidad, perfeccionando las tradicionales técnicas de elaboración de embutidos.

Se conoce que uno de los parámetros más importantes dentro de la elaboración de embutidos crudo-curado-madurados corresponde la fase de fermentación, en la cual se busca durante las primeras 24 a 48 horas de elaboración, reducir el pH de la mezcla cárnica cruda a valores menores a 5,3 para alcanzar el punto isoeléctrico de las proteínas y dar lugar a la ligazón entre los distintos componentes, y además eliminar los posibles microorganismos patógenos y contaminantes existentes dando así seguridad de consumo, al mantener la inocuidad del producto cárnico.

Lo anterior, fácilmente puede ser solucionado mediante la adición de cultivos iniciadores durante el proceso de elaboración de embutidos crudo-madurados. De ésta manera se consigue además del control del desarrollo

de microflora contaminante y patógena, el sustancial mejoramiento de las propiedades sensoriales del producto madurado.

Consecuentemente, de acuerdo al análisis de varianza aplicado en el diseño experimental, se estableció como mejor tratamiento el a₁b₁ (Bactoferm™ F-RM-52 con 24 horas de estufaje) de acuerdo a los criterios de: descenso de pH luego de las 24 horas de elaboración, evaluación de sabor y aceptabilidad. De tal manera, la propuesta tecnológica que se plantea es la elaboración de chorizo (tipo Ambateño) madurado a escala semi-industrial utilizando como cultivo iniciador Bactoferm™ F-RM-52 y 24 horas de estufaje a 35-37 °C; debido a que los citados parámetros de elaboración desarrollan y potencian favorablemente las características físico-químicas y organolépticas de chorizo (tipo Ambateño) madurado.

14.3. JUSTIFICACIÓN

Hoy en día el consumidor es más exigente, en cuanto a calidad y seguridad alimentaria se refiere, por lo que las empresas cárnicas deben tener una capacidad de respuesta más rápida con estructuras y operaciones acordes a los nuevos requerimientos de los clientes.

Por lo tanto, la industria cárnica tiende la imperiosa necesidad de mejorar su propia imagen y la de sus productos, y desde otra perspectiva, ofrecer al consumidor productos de rápida preparación a precios accesibles. Por ejemplo, mediante la innovación y mejoramiento de productos existentes en el mercado, tal como la maduración de chorizo (tipo Ambateño) que presenta un alto consumo en la localidad, siendo parte intrínseca de la gastronomía del sector. De ahí que, la maduración del producto dará como resultado el mejoramiento de su calidad, con el subsiguiente cambio de las preferencias de consumo hacia productos de tipo madurado, los cuales no requieren tratamientos térmicos para su consumo.

El empleo de microorganismos iniciadores en la elaboración de alimentos, es una práctica que ha cobrado fuerza en los últimos años. Especialmente, su utilización en la elaboración de productos cárnicos

madurados debido a que desarrollan y mejoran las características funcionales de la carne.

Según Leistner (1992): “La base de la amplia variedad de embutidos crudos curados fermentados que existen en el mercado radica en una tecnología de fabricación flexible que permite realizar modificaciones siempre que se mantengan las reducciones adecuadas de pH y a_w ”.

Por lo tanto, éste propuesta presenta una importancia práctica por cuanto se busca utilizar Bactoferm™ F-RM-52 y 24 horas de estufaje en la elaboración de chorizo (tipo Ambateño) madurado, de tal manera que se da un gran valor agregado a un producto tan tradicional como lo es el chorizo (tipo Ambateño); además que permite controlar adecuadamente el proceso de elaboración, de manera que se estandarice cada una de las etapas de producción, así como la calidad e inocuidad del producto elaborado.

14.4. OBJETIVOS

14.4.1. Objetivo General

- Elaborar chorizo (tipo Ambateño) madurado utilizando Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*) y 24 horas de estufaje.

14.4.2. Objetivos Específicos

- Determinar las proporciones adecuadas de carne de res, cerdo y grasa que favorezcan la correcta maduración de chorizo (tipo Ambateño).
- Desarrollar un plan de acción para la elaboración de chorizo (tipo Ambateño) madurado a nivel semi-industrial.
- Establecer el análisis económico de producción de chorizo (tipo Ambateño) madurado en escala semi-industrial.

14.5. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD

La fase tecnológica que conlleva el presente estudio corresponde a la elaboración de un producto cárnico: chorizo (tipo Ambateño) madurado, y de acuerdo al análisis sensorial realizado se determinó que el tratamiento a_1b_1 (Bactoferm™ F-RM-52 con 24 horas de estufaje) es el mejor; por lo tanto, sobre él se realiza el análisis de factibilidad correspondiente.

Es preciso considerar que el análisis económico se efectúa con el objeto de establecer la posibilidad de obtener un embutido de óptimas características sensoriales y con un precio de venta al público adecuado para ingresar en el mercado.

Para determinar el costo de producción, tanto los suministros como el personal se encuentran especificados en el Anexo G, Tablas G-1, G-2, G-3, G-4 y G-5, para la producción total de una parada equivalente a 6,61 Kg y el costo de producción se obtendrá por 250 gramos; por lo cual, se realiza la relación respectiva.

El estudio fue realizado en condiciones semi-industriales dando como resultado 6,61 Kg por parada de producto, con un total 105 Kg incluyendo la réplica. Sin embargo, el estudio económico es realizado únicamente para el mejor tratamiento (a_1b_1), obteniéndose un valor de precio de venta al público de 250 gramos de embutido de \$3,09. Dicho valor es aceptable en comparación a los productos que comúnmente se expenden en ésta rama, considerándose que las materias primas empleadas en el proceso de elaboración fueron de la mejor calidad.

14.6. FUNDAMENTACIÓN

Los productos alimenticios y sus derivados fácilmente pueden ser contaminados con microorganismos y, si ellos no son adecuadamente manejados y preservados, ayudan al crecimiento de bacterias contaminantes y patogénicas, llevando a la pérdida de calidad de los productos y constituye en un potencial problema de salud pública.

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

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

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

La utilización de cultivos iniciadores en la industria cárnica está ampliamente difundida. Los cultivos iniciadores, según la definición de Leistner y Echardt (1979), son microorganismos que se presentan en estado puro o mixto, seleccionados de acuerdo con sus propiedades específicas y que se agregan a los alimentos con objeto de mejorar su aspecto, aroma y sabor, así como la conservación de los mismos. Los microorganismos añadidos se instauran como flora predominante dirigiendo la fermentación y excluyendo a la flora indeseable, así se reducen los riesgos higiénicos y de fabricación por deficiencias de origen microbiano.

Los microorganismos empleados por la biotecnología de productos cárnicos fermentados son muy diversos, pero sus roles están claramente definidos por las etapas del proceso tecnológico; por lo tanto, contribuyen a la especificidad del producto final. Dependiendo de la principal acción tomada, los cultivos iniciadores pueden ser categorizados como: cultivos acidificantes, cultivos que llevan a la formación de color y sabor, cultivos

para cobertura de superficie o cultivos para bio-protección. (Roman *et al.*, 2006).

Descripción del proceso de elaboración de chorizo (tipo Ambateño) madurado con uso de Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*) con 24 horas de estufaje.

Recepción. Para la elaboración de un chorizo (tipo Ambateño) madurado de buena calidad se trabaja con carne de res, cerdo y grasa frescos, y sin indicios de contaminación.

Preparación de la carne y grasa. Se congela la carne y grasa por un lapso mínimo de 12 horas previo al proceso de elaboración, para prevenir el derretimiento de la grasa, y la alteración de las proteínas cárnicas.

Pesado. La carne y grasa se pesan para determinar la cantidad de materia prima y otros insumos y aditivos a utilizarse.

Troceado. Se realiza manualmente troceando la carne en fragmentos de 5 a 10 cm.

Molido. La carne y grasa troceadas se muelen en un molido de carne industrial con el tamaño de grano adecuado.

Mezclado. La carne y grasa molidas se mezclan manualmente, de manera que se obtenga una masa cárnica homogénea.

Adición de condimentos y aditivos. Una vez mezclada la carne y grasa se incorporan los aditivos y condimentos, excepto la sal.

Adición de sal. La adición de sal se realiza lo más tarde posible, junto con nitrito de sodio, para evitar problemas con las proteínas de la carne que pueden afectar la calidad de la masa.

Inoculación. Una vez que se ha obtenido la masa cárnica se agrega el cultivo iniciador (2,5 gramos en 10 kilos de producto), que será responsable de la fermentación del producto cárnico, con el subsiguiente desarrollo de las propiedades organolépticas durante el proceso de maduración y secado.

Embutido. En ésta etapa se elimina el aire que pueda quedar dentro de la masa, lo cual se consigue alimentando la embutidora con bolas de masa y/o pinchando la misma. La presión del llenado debe ser correcta, al igual que el diámetro del tubo de llenado debe acomodarse al calibre de las tripas. Se emplea tripa natural de cerdo.

Atado de la tripa y colgado de los embutidos. Se realiza para impedir la disminución de la presión de relleno. Se utiliza cuerda larga (hilo chillo).

Estufado y fermentación. Una vez embutida la pasta, ésta se somete a una temperatura de 35 – 37 °C, óptima para el desarrollo de los microorganismos de los cultivos iniciadores empleados, por un tiempo de 24 horas. El objetivo es que durante éste tiempo la curación sea rápida y mayor. Durante ésta etapa se realizarán análisis de pH, acidez titulable, pérdida de peso, análisis microbiológico de *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*.

Maduración. La cámara de maduración debe tener una temperatura de 12 a 16 °C y una humedad relativa de 70 a 85%. Para que se desarrollen los atributos organolépticos propios de un producto madurado. Durante ésta etapa se continuarán realizando análisis de pH, acidez titulable, pérdida de peso, análisis microbiológico de *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*.

Ahumado. Luego de alcanzar un porcentaje de pérdida de peso de 30 a 35% se suspende el secado, y se realiza un ahumado a 100 °C durante 30 minutos.

Almacenamiento.- Después del proceso de maduración, los embutidos se almacenan en un ambiente limpio a temperaturas de refrigeración de 4 a 7 °C a una humedad relativa de 70 a 85%.

14.7. METODOLOGÍA

Tabla 9: Modelo Operativo (Plan de Acción)

Fases	Metas	Actividades	Responsable	Recursos	Presupuesto	Tiempo
1. Formular la propuesta	Diseñar la tecnología apropiada de elaboración de chorizo (tipo Ambateño) madurado con el uso de Bactoferm™ F-RM-52 a nivel semi-industrial.	Revisión bibliográfica	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	\$20	0,5 meses
2. Desarrollo preliminar de la propuesta	Realizar análisis económicos de implementación de la tecnología propuesta de elaboración de chorizo (tipo Ambateño) madurado.	Capacidad de producción de chorizo (tipo Ambateño) madurado	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	\$60	0,5 meses
3. Implementación de la propuesta	Ejecución de la propuesta	Elaboración del producto cárnico madurado	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	\$200	1.5 meses
4. Evaluación de la propuesta	Verificación de los puntos de control en la elaboración de chorizo (tipo Ambateño) madurado.	Comprobación con datos experimentales	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	\$20	0.5 meses

14.8. ADMINISTRACIÓN

Tabla 10: Administración

Indicadores a mejorar	Situación actual	Resultados esperados	Actividades	Responsables
Tecnología de elaboración de chorizo (tipo Ambateño) madurado.	Nulo uso de cultivos iniciadores en la formulación de chorizo (tipo Ambateño).	<p>Producción de productos cárnicos con calidad e inocuidad alimentaria.</p> <p>Desarrollo de una cultura de uso de cultivos iniciadores en productos cárnicos.</p> <p>Disponibilidad en el mercado de productos cárnicos madurados de calidad, como chorizo (tipo Ambateño).</p>	<p>Elaborar el mejor tratamiento (a₁b₁: Bactoferm™ F-RM-52 con 24 horas de estufaje); con diferente proporción de carne de res, cerdo y grasa.</p> <p>Aplicar un análisis sensorial a los tratamientos con diferente proporción de carne de res, cerdo y grasa.</p>	Investigador: Lenin Sarabia

14.9. PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN

Tabla 11: Previsión de la evaluación

PREGUNTAS BÁSICAS	EXPLICACIÓN
¿Quiénes solicitan evaluar?	Personas de la rama de Ingeniería de Alimentos Industria alimenticia y Consumidor final
¿Por qué evaluar?	Debido a que de ésta manera se garantiza la elaboración de un producto cárnico madurado de excelente calidad. Evitar y corregir errores que pudiesen suscitarse en el proceso de fabricación.
¿Para qué evaluar?	Verificar la inocuidad y calidad del producto. Para optimizar la utilización de recursos durante la elaboración, y reducir mermas del producto.
¿Qué evaluar?	Materias primas utilizadas Procesos de fermentación, maduración y secado. Calidad microbiológica del producto.
¿Quién evalúa?	El investigador
¿Cuándo evaluar?	Desde los procesos de fermentación, maduración y secado de chorizo (tipo Ambateño) madurado, hasta su expendio.
¿Cómo evaluar?	Realizando mediciones de las propiedades físico-químicas del producto: pH, acidez titulable, pérdida de peso. Aplicando análisis microbiológicos de microorganismos patógenos tales como: <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> .
¿Con qué evaluar?	Mediante experimentación Normas Nacionales e Internacionales. Referencias bibliográficas

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA

7.1. LIBROS

- BACUS, J. (1984). Utilization of microorganisms in meat processing. A handbook for meat plant operators. Research Studies Press LTD., Letchworth, Hertfordshire, Reino Unido. 320 pp.
- BOGNER Hermann (1969) “Tecnología de la Carne”, Edición única, Editorial Acribia, Zaragoza – España, 115 pp.
- BROCK. (2002). Biology of Microorganisms. Prentice Hall, Southern Illinois University Carbondale, USA. 1140 pp.
- FRAIZER, W. C. y WESTHOFF, D. C. (1993). *Microbiología de los Alimentos*, 4ª ed. Ed. Acribia. Zaragoza– España, 400 pp.
- FREY Werner (1983) “Fabricación Fiable de Embutidos” Edición única, Editorial Acribia, Zaragoza – España, 194 pp.
- GIRARD, J.P., DENOYER, C. y MAILLARD, T. (1991). El picado grosero. La reestructuración de las pastas finas. En *Tecnología de la carne y de los productos cárnicos*, Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, pp. 231-295.
- LEISTNER, F. (1992). The essentials of producing stable and safe raw fermented sausages. En *New technologies for meat and meat products*. Smulders, F.J.M., Toldrà, F., Flores, J. y Prieto, M.(eds.). Utrecht: ECCEAMST, Nijmegen: Audet Tijdschriften, Holanda. pp 1-19

- LEISTNER, L. y HECHELMANN, H. (1993). Food preservation by hurdle-technology. En *Proceedings Food preservation 2000 conference*. 19-21 October, Nattick, Massachusetts. EE.UU., pp. 511-520.
- LÜCKE, F. K. (1998). Fermented sausages. En *Microbiology of Fermented Foods*, Wood, B. J. B. (ed), Blackie Academic and Professional. Londres, Reino Unido. pp. 441-483
- MOLLY, K., DEMEYER, D., JOHANSSON, G., RAEMAEEKERS, M., GHISTELINCK, M. y GEENEN, I. (1997). The importance of meat enzymes in ripening and flavour generation in dry fermented sausages. First results of a European project. *Food Chem.* 59, 539-545.
- RODRÍGUEZ-REBOLLO, M. (1998). Manual de industrias cárnicas. Editado por Publicaciones técnicas Alimentarias, S.A., Cárnica 2000.
- SAINZ Rufo (1980) “Chacinería Práctica” Edición Sexta, Editorial Sinter S.A., Barcelona – España, 215 pp.
- SALTOS Aníbal (1993) “Diseño Experimental””, Edición única, Ambato – Ecuador, pp 43-49.
- VARNAN, A.H. y SUTHERLAND, J.P. (1998). Carne y productos cárnicos. Tecnología, química y microbiología. Editorial Acribia, S.A., Zaragoza-España, 350 pp.
- ZEUTHEN, P y BØGH-SØRENSEN L., (2003). First edition, “Food preservation techniques”, Woodhead Publishing Limited, Cambridge-Inglaterra, 600 pp.

7.2. JOURNALS

- DEMEYER, D.I., HOOZEE, J., y MESDON, H. (1974). Specificity of lipolysis during dry sausage ripening. *J. Food Sci.* 39, 293-296.
- FLORES, J. (1999). Propuesta de clasificación de los embutidos crudos curados españoles. *AICE* 64, 5-8.

- GARCÍA, M.L., SELGAS, M.D., FERNÁNDEZ, M. y ORDÓÑEZ, J.A. (1992). Microorganisms and lipolysis in the ripening of dry fermented sausages. *Int. J. Food Sci. Technol.* 27, 675-682.
- KLETTNER, P. G. y RÖDEL, W. (1978). Überprüfung und Steuerung wichtiger Parameter bei der Rohwurstreifung. *Fleischwirtschaft* 58, 57-60, 63-64, 66.
- LEISTNER, L. (1986). Allgemeines über Rohwurst. *Fleischwirtschaft* 47, 1320-1326.
- LEISTNER, L. and ECHARDT, C. (1979). Vorkommen toxinogener Penicillien bei Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtschaft* 59, 1892-1896.
- LOIS, A. L., GUTIÉRREZ, M. L., ZUMALACÁRREGUI, J. M. y LÓPEZ, A. (1987). Changes in several constituents during the ripening of "Chorizo" - a Spanish dry sausage. *Meat Sci.* 19, 169-177.
- ORDÓÑEZ, J.A., HIERRO, E.M., BRUNA, J.M., DE LA HOZ, L. (1999). Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 39, 329-367.
- ROCA, M. y INCZE, K. (1990). Fermented sausages. *Food Rev. Int.* 6, 91-118.
- ROMAN, M *et al.*, (2006). The variation of sensorial characteristics in Chorizo made with starter cultures. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies.* 8

7.3. TESIS

- JUÁREZ, Belén Martín. (2005). Estudio de las comunidades microbianas de embutidos fermentados ligeramente acidificados mediante técnicas moleculares. Estandarización, seguridad y mejora tecnológica. Universitat de Girona, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries

- KINSMAN, D. M. (1980). Principal characteristics of sausages of the world listed by country of origin. American Press. Boston, Massachusetts, EE.UU.
- PAZMIÑO Nelly, (2005) "Formulación para la elaboración de Salchichas Frankfurt con Diferentes Porcentajes de Emulsión de Soja y Estudio de la Aceptabilidad Organoléptica" 49 pp.

7.4. INTERNET

- HEINZ, G., Huatzinger, P., (2007), MEAT PROCESSING TECHNOLOGY: For small – to medium – scale producers, FAO, Bangkok, consultado: 13-06-2011, disponible en: <http://www.fao.org/docrep/>
- UNAL, (2005). Importancia de los cultivos iniciadores y sus productos metabólicos, consultado: 13-04-2011, disponible en <http://www.virtual.unal.edu.co/cursos>

ANEXOS

ANEXOS A
RESPUESTAS EXPERIMENTALES

Tabla A-1. Cambios de pH de los tratamientos experimentales durante el proceso de fermentación y maduración.

Tratamiento	TIEMPO (horas)													
	0	3	5	7	9	16	20	24	48	65	72	89	96	120
a₀b₀R₁	6,98	6,88	6,71	6,54	6,36	5,76	5,77	5,71	5,69	5,84	5,67	5,93	5,94	5,91
a₀b₀R₂	6,92	6,83	6,76	6,62	6,29	5,70	5,72	5,65	5,64	5,66	5,64	5,66	5,67	5,75
Promedio	6,95	6,86	6,74	6,58	6,33	5,73	5,75	5,68	5,67	5,75	5,66	5,80	5,81	5,83
a₀b₁R₁	6,98	6,88	6,71	6,54	6,36	5,76	5,82	5,76	5,73	5,75	5,59	5,73	5,76	5,74
a₀b₁R₂	6,90	6,82	6,65	6,48	6,32	5,73	5,72	5,79	5,70	5,69	5,73	5,77	5,82	5,79
Promedio	6,94	6,85	6,68	6,51	6,34	5,75	5,77	5,78	5,72	5,72	5,66	5,75	5,79	5,77
a₁b₀R₁	6,73	6,63	6,41	6,2	5,98	5,22	5,20	5,14	5,15	5,40	5,30	5,28	5,18	5,15
a₁b₀R₂	6,78	6,58	6,33	6,27	6,04	5,27	5,26	5,19	5,18	5,20	5,18	5,2	5,22	5,16
Promedio	6,76	6,61	6,37	6,24	6,01	5,25	5,23	5,17	5,17	5,30	5,24	5,24	5,20	5,16
a₁b₁R₁	6,73	6,63	6,41	6,2	5,98	5,22	5,11	5,11	5,12	5,34	5,20	5,16	5,24	5,22
a₁b₁R₂	6,68	6,54	6,49	6,26	6,03	5,28	5,16	5,14	5,10	5,20	5,19	5,20	5,19	5,19
Promedio	6,71	6,59	6,45	6,23	6,01	5,25	5,14	5,13	5,11	5,27	5,20	5,18	5,22	5,21
a₂b₀R₁	6,96	6,87	6,70	6,54	6,37	5,79	5,62	5,66	5,67	5,88	5,77	5,91	5,95	5,94
a₂b₀R₂	6,88	6,81	6,65	6,48	6,33	5,76	5,69	5,69	5,64	5,62	5,66	5,65	5,68	5,70
Promedio	6,92	6,84	6,68	6,51	6,35	5,78	5,66	5,68	5,66	5,75	5,72	5,78	5,82	5,82
a₂b₁R₁	6,96	6,87	6,70	6,54	6,37	5,79	5,73	5,75	5,76	5,97	5,95	6,02	6,12	6,10
a₂b₁R₂	7,02	6,92	6,73	6,47	6,34	5,82	5,79	5,76	5,72	5,76	5,81	5,79	5,83	5,85
Promedio	6,99	6,90	6,72	6,51	6,36	5,81	5,76	5,76	5,74	5,87	5,88	5,91	5,98	5,98

a₃b₀R₁	6,78	6,65	6,43	6,22	6,00	5,24	5,33	5,26	5,25	5,91	5,36	5,51	5,61	5,60
a₃b₀R₂	6,81	6,58	6,40	6,25	6,06	5,25	5,29	5,29	5,28	5,30	5,31	5,35	5,38	5,41
Promedio	6,80	6,62	6,42	6,24	6,03	5,25	5,31	5,28	5,27	5,61	5,34	5,43	5,50	5,51
a₃b₁R₁	6,78	6,65	6,43	6,22	6,00	5,24	5,29	5,16	5,15	5,39	5,24	5,28	5,45	5,45
a₃b₁R₂	6,73	6,59	6,39	6,19	6,07	5,27	5,26	5,30	5,32	5,31	5,33	5,31	5,34	5,31
Promedio	6,76	6,62	6,41	6,21	6,04	5,26	5,28	5,23	5,24	5,35	5,29	5,30	5,40	5,38

Factor a: Tipo de mezcla de microorganismos

Nivel a₀: Bactoferm™ LHP (*Pediococcus acidilactici* & *Pediococcus pentosaceus*)

Nivel a₁: Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*)

Nivel a₂: Bactoferm™ F-LC (*Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus* and *Staphylococcus xylosus*)

Nivel a₃: Cultivo lácteo SLB 95₃ (*Lactobacillus bulgaricus* & *Streptococcus thermophilus*)

Factor b: Tiempo de estufaje

Nivel b₀: 16 horas

Nivel b₁: 24 horas

Tabla A-2. Consumo de NaOH 0,1N (ml) de los tratamientos experimentales durante el proceso de fermentación y maduración.

Tratamiento	TIEMPO (horas)													
	0	3	5	7	9	16	20	24	48	65	72	89	96	120
a₀b₀R₁	0,500	0,700	0,840	0,980	1,120	1,600	1,600	1,700	1,750	1,800	1,800	1,900	1,900	1,900
a₀b₀R₂	0,600	0,750	0,880	1,010	1,140	1,600	1,750	1,850	1,900	1,950	1,950	2,050	2,050	2,050
Promedio	0,550	0,725	0,860	0,995	1,130	1,600	1,675	1,775	1,825	1,875	1,875	1,975	1,975	1,975
a₀b₁R₁	0,500	0,700	0,840	0,980	1,120	1,600	1,600	1,700	1,900	2,100	2,100	2,000	2,000	2,000
a₀b₁R₂	0,600	0,750	0,880	1,010	1,140	1,600	1,750	1,850	2,150	2,200	2,200	2,300	2,300	2,300
Promedio	0,550	0,725	0,860	0,995	1,130	1,600	1,675	1,775	2,025	2,150	2,150	2,150	2,150	2,150
a₁b₀R₁	0,500	0,600	0,720	0,850	0,970	1,400	1,700	1,800	1,850	1,900	1,900	2,000	2,000	2,000
a₁b₀R₂	0,650	0,800	0,930	1,060	1,190	1,650	1,800	1,900	1,950	2,000	2,050	2,050	2,100	2,100
Promedio	0,575	0,700	0,825	0,955	1,080	1,525	1,750	1,850	1,900	1,950	1,975	2,025	2,050	2,050
a₁b₁R₁	0,500	0,600	0,720	0,850	0,970	1,400	1,450	1,500	1,800	2,100	2,100	2,000	2,000	2,100
a₁b₁R₂	0,650	0,800	0,930	1,060	1,190	1,650	1,680	1,750	2,050	2,150	2,150	2,200	2,250	2,250
Promedio	0,575	0,700	0,825	0,955	1,080	1,525	1,565	1,625	1,925	2,125	2,125	2,100	2,125	2,175
a₂b₀R₁	0,600	0,600	0,720	0,850	0,970	1,400	1,600	1,600	1,900	2,200	2,200	2,200	2,200	2,200
a₂b₀R₂	0,680	0,830	0,960	1,090	1,220	1,680	1,830	1,930	1,980	2,030	2,030	2,130	2,130	2,130
Promedio	0,640	0,715	0,840	0,970	1,095	1,540	1,715	1,765	1,940	2,115	2,115	2,165	2,165	2,165
a₂b₁R₁	0,600	0,600	0,720	0,850	0,970	1,400	1,400	1,500	1,900	2,400	2,400	2,400	2,400	2,400
a₂b₁R₂	0,700	0,800	1,000	1,100	1,200	1,700	1,800	1,900	2,200	2,400	2,500	2,500	2,500	2,500
Promedio	0,650	0,700	0,860	0,975	1,085	1,550	1,600	1,700	2,050	2,400	2,450	2,450	2,450	2,450

a₃b₀R₁	0,500	0,600	0,680	0,770	0,850	1,150	1,700	1,800	1,900	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000
a₃b₀R₂	0,650	0,800	0,930	1,060	1,180	1,630	1,730	1,820	2,020	2,100	2,150	2,150	2,150	2,150
Promedio	0,575	0,700	0,805	0,915	1,015	1,390	1,715	1,810	1,960	2,050	2,075	2,075	2,075	2,075
a₃b₁R₁	0,500	0,600	0,680	0,770	0,850	1,150	1,600	1,700	1,900	2,100	2,100	2,100	2,100	2,100
a₃b₁R₂	0,650	0,800	0,930	1,060	1,180	1,630	1,730	1,820	1,870	1,920	1,920	2,020	2,020	2,020
Promedio	0,575	0,700	0,805	0,915	1,015	1,390	1,665	1,760	1,885	2,010	2,010	2,060	2,060	2,060

Factor a: Tipo de mezcla de microorganismos

Nivel a₀: Bactoferm™ LHP (*Pediococcus acidilactici* & *Pediococcus pentosaceus*)

Nivel a₁: Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*)

Nivel a₂: Bactoferm™ F-LC (*Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus* and *Staphylococcus xylosus*)

Nivel a₃: Cultivo lácteo SLB 95₃ (*Lactobacillus bulgaricus* & *Streptococcus thermophilus*)

Factor b: Tiempo de estufaje

Nivel b₀: 16 horas

Nivel b₁: 24 horas

Tabla A-3. Peso (g) de los tratamientos experimentales durante el proceso de fermentación y maduración.

Tratamiento	TIEMPO (horas)													
	0	3	5	7	9	16	20	24	48	65	72	89	96	120
a₀b₀R₁	351,5	342,6	336,3	328,0	325,1	306,0	298,0	294,0	275,0	265,0	260,8	250,8	246,7	232,5
a₀b₀R₂	469,5	456,1	446,7	435,3	429,3	400,1	390,5	385,6	358,7	348,0	341,5	327,0	320,0	300,3
a₀b₁R₁	378,5	371,1	365,8	358,8	356,4	340,5	326,9	316,0	301,0	292,2	288,5	279,7	276,0	263,5
a₀b₁R₂	653,5	638,3	627,7	614,9	608,1	574,7	548,5	531,8	497,1	485,2	478,3	462,2	454,5	432,8
a₁b₀R₁	540,0	529,9	522,8	513,4	510,1	488,5	476,1	471,0	444,0	428,8	422,5	407,3	401,0	379,5
a₁b₀R₂	377,0	368,5	362,6	355,3	351,5	332,9	325,1	321,5	299,5	292,2	287,2	276,2	270,5	254,9
a₁b₁R₁	447,0	438,0	431,7	423,2	420,3	401,0	384,4	371,0	353,0	342,4	338,0	327,4	323,0	308,0
a₁b₁R₂	376,0	366,5	359,9	351,9	347,5	326,5	313,0	300,2	286,4	278,5	274,6	265,1	261,1	247,9
a₂b₀R₁	508,0	499,3	493,2	485,0	482,2	463,5	453,1	448,5	428,0	415,6	410,5	398,1	393,0	375,5
a₂b₀R₂	350,5	343,1	337,9	331,7	328,3	312,1	305,1	301,8	287,9	279,7	275,8	266,4	262,1	249,0
a₂b₁R₁	426,5	418,1	412,2	404,3	401,5	383,5	367,6	355,0	337,0	326,7	322,5	312,2	308,0	293,5
a₂b₁R₂	140,5	137,0	134,4	131,5	130,0	122,1	117,0	112,9	107,2	104,0	102,4	98,9	97,4	92,6
a₃b₀R₁	284,5	278,7	274,6	269,2	267,3	254,9	248,6	245,8	232,1	224,4	221,2	213,5	210,3	199,5
a₃b₀R₂	486,7	474,8	466,6	456,6	451,1	425,1	415,2	410,4	384,3	373,0	366,4	352,2	345,5	326,0
a₃b₁R₁	219,0	214,6	211,6	207,5	206,1	196,8	188,7	182,3	173,4	168,2	166,0	160,8	158,7	151,4
a₃b₁R₂	534,6	521,2	513,4	503,8	499,7	465,0	445,8	428,6	408,0	396,4	390,3	376,8	370,5	352,4

Factor a: Tipo de mezcla de microorganismos

Nivel a₀: Bactoferm™ LHP (*Pediococcus acidilactici* & *Pediococcus pentosaceus*)

Nivel a₁: Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*)

Nivel a₂: Bactoferm™ F-LC (*Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus* and *Staphylococcus xylosus*)

Nivel a₃: Cultivo lácteo SLB 95₃ (*Lactobacillus bulgaricus* & *Streptococcus thermophilus*)

Factor b: Tiempo de estufaje

Nivel b₀: 16 horas

Nivel b₁: 24 horas

Tabla A-4. Cambios de acidez titulable (% ácido láctico) de los tratamientos experimentales durante el proceso de fermentación y maduración.

Tratamiento	TIEMPO (horas)													
	0	3	5	7	9	16	20	24	48	65	72	89	96	120
a₀b₀R₁	0,450	0,630	0,750	0,880	1,000	1,440	1,440	1,530	1,580	1,620	1,620	1,710	1,710	1,710
a₀b₀R₂	0,540	0,680	0,790	0,910	1,030	1,440	1,580	1,670	1,710	1,760	1,760	1,850	1,850	1,850
Promedio	0,495	0,655	0,770	0,895	1,015	1,440	1,510	1,600	1,645	1,690	1,690	1,780	1,780	1,780
a₀b₁R₁	0,450	0,630	0,750	0,880	1,000	1,440	1,440	1,530	1,710	1,890	1,890	1,800	1,800	1,800
a₀b₁R₂	0,540	0,680	0,790	0,910	1,030	1,440	1,580	1,670	1,940	1,980	1,980	2,070	2,070	2,070
Promedio	0,495	0,655	0,770	0,895	1,015	1,440	1,510	1,600	1,825	1,935	1,935	1,935	1,935	1,935
a₁b₀R₁	0,450	0,540	0,650	0,760	0,870	1,260	1,530	1,620	1,670	1,710	1,710	1,800	1,800	1,800
a₁b₀R₂	0,590	0,720	0,840	0,960	1,070	1,490	1,620	1,710	1,760	1,800	1,850	1,850	1,890	1,890
Promedio	0,520	0,630	0,745	0,860	0,970	1,375	1,575	1,665	1,715	1,755	1,780	1,825	1,845	1,845
a₁b₁R₁	0,450	0,540	0,650	0,760	0,870	1,260	1,310	1,350	1,620	1,890	1,890	1,800	1,800	1,890
a₁b₁R₂	0,590	0,720	0,840	0,960	1,070	1,490	1,510	1,580	1,850	1,940	1,940	1,980	2,030	2,030
Promedio	0,520	0,630	0,745	0,860	0,970	1,375	1,410	1,465	1,735	1,915	1,915	1,890	1,915	1,960
a₂b₀R₁	0,540	0,540	0,650	0,760	0,870	1,260	1,440	1,440	1,710	1,980	1,980	1,980	1,980	1,980
a₂b₀R₂	0,610	0,740	0,860	0,980	1,100	1,510	1,640	1,730	1,780	1,820	1,820	1,910	1,910	1,910
Promedio	0,575	0,640	0,755	0,870	0,985	1,385	1,540	1,585	1,745	1,900	1,900	1,945	1,945	1,945
a₂b₁R₁	0,540	0,540	0,650	0,760	0,870	1,260	1,260	1,350	1,710	2,160	2,160	2,160	2,160	2,160
a₂b₁R₂	0,610	0,740	0,860	0,980	1,100	1,510	1,640	1,730	1,980	2,140	2,230	2,270	2,270	2,270
Promedio	0,575	0,640	0,755	0,870	0,985	1,385	1,450	1,540	1,845	2,150	2,195	2,215	2,215	2,215

a₃b₀R₁	0,450	0,540	0,620	0,690	0,770	1,040	1,530	1,620	1,710	1,800	1,800	1,800	1,800	1,800
a₃b₀R₂	0,590	0,720	0,840	0,950	1,070	1,470	1,560	1,640	1,820	1,890	1,940	1,940	1,940	1,940
Promedio	0,520	0,630	0,730	0,820	0,920	1,255	1,545	1,630	1,765	1,845	1,870	1,870	1,870	1,870
a₃b₁R₁	0,450	0,540	0,620	0,690	0,770	1,040	1,440	1,530	1,710	1,890	1,890	1,890	1,890	1,890
a₃b₁R₂	0,590	0,720	0,840	0,950	1,070	1,470	1,560	1,640	1,680	1,730	1,730	1,820	1,820	1,820
Promedio	0,520	0,630	0,730	0,820	0,920	1,255	1,500	1,585	1,695	1,810	1,810	1,855	1,855	1,855

Factor a: Tipo de mezcla de microorganismos

Nivel a₀: Bactoferm™ LHP (*Pediococcus acidilactici* & *Pediococcus pentosaceus*)

Nivel a₁: Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*)

Nivel a₂: Bactoferm™ F-LC (*Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus* and *Staphylococcus xylosus*)

Nivel a₃: Cultivo lácteo SLB 95₃ (*Lactobacillus bulgaricus* & *Streptococcus thermophilus*)

Factor b: Tiempo de estufaje

Nivel b₀: 16 horas

Nivel b₁: 24 horas

Tabla A-5. Pérdida de peso (%) de los tratamientos experimentales durante el proceso de fermentación y maduración.

Tratamiento	TIEMPO (horas)													
	0	3	5	7	9	16	20	24	48	65	72	89	96	120
a₀b₀R₁	0,00	2,54	4,31	6,70	7,52	12,94	15,22	16,36	21,76	24,62	25,79	28,65	29,82	33,85
a₀b₀R₂	0,00	2,86	4,85	7,29	8,56	14,79	16,82	17,88	23,61	25,89	27,27	30,36	31,84	36,04
Promedio	0,00	2,70	4,58	7,00	8,04	13,87	16,02	17,12	22,69	25,26	26,53	29,51	30,83	34,95
a₀b₁R₁	0,00	1,97	3,35	5,19	5,83	10,04	13,64	16,51	20,48	22,81	23,78	26,12	27,08	30,38
a₀b₁R₂	0,00	2,33	3,94	5,91	6,95	12,05	16,07	18,62	23,93	25,75	26,81	29,27	30,45	33,77
Promedio	0,00	2,15	3,65	5,55	6,39	11,05	14,86	17,57	22,21	24,28	25,30	27,70	28,77	32,08
a₁b₀R₁	0,00	1,87	3,18	4,93	5,54	9,54	11,83	12,78	17,78	20,60	21,76	24,58	25,74	29,72
a₁b₀R₂	0,00	2,26	3,81	5,75	6,76	11,71	13,77	14,72	20,56	22,50	23,81	26,74	28,25	32,39
Promedio	0,00	2,07	3,50	5,34	6,15	10,63	12,80	13,75	19,17	21,55	22,79	25,66	27,00	31,06
a₁b₁R₁	0,00	2,02	3,43	5,32	5,98	10,29	14,00	17,00	21,03	23,41	24,38	26,76	27,74	31,10
a₁b₁R₂	0,00	2,53	4,28	6,42	7,59	13,15	16,76	20,17	23,84	25,93	26,97	29,49	30,56	34,06
Promedio	0,00	2,28	3,86	5,87	6,79	11,72	15,38	18,59	22,44	24,67	25,68	28,13	29,15	32,58
a₂b₀R₁	0,00	1,72	2,92	4,53	5,09	8,76	10,81	11,71	15,75	18,19	19,19	21,63	22,64	26,08
a₂b₀R₂	0,00	2,12	3,59	5,36	6,33	10,96	12,97	13,90	17,86	20,20	21,31	23,99	25,22	28,95
Promedio	0,00	1,92	3,26	4,95	5,71	9,86	11,89	12,81	16,81	19,20	20,25	22,81	23,93	27,52
a₂b₁R₁	0,00	1,98	3,36	5,22	5,85	10,08	13,82	16,76	20,98	23,39	24,38	26,79	27,78	31,18
a₂b₁R₂	0,00	2,51	4,35	6,44	7,50	13,10	16,75	19,67	23,69	26,00	27,10	29,58	30,71	34,12
Promedio	0,00	2,25	3,86	5,83	6,68	11,59	15,29	18,22	22,34	24,70	25,74	28,19	29,25	32,65

a₃b₀R₁	0,00	2,04	3,47	5,39	6,05	10,41	12,62	13,62	18,43	21,13	22,25	24,95	26,07	29,89
a₃b₀R₂	0,00	2,44	4,12	6,19	7,32	12,66	14,69	15,67	21,04	23,36	24,71	27,64	29,01	33,02
Promedio	0,00	2,24	3,80	5,79	6,69	11,54	13,66	14,65	19,74	22,25	23,48	26,30	27,54	31,46
a₃b₁R₁	0,00	1,99	3,38	5,24	5,89	10,14	13,82	16,76	20,83	23,20	24,18	26,56	27,54	30,89
a₃b₁R₂	0,00	2,51	3,96	5,76	6,54	13,03	16,62	19,83	23,68	25,85	26,98	29,52	30,70	34,09
Promedio	0,00	2,25	3,67	5,50	6,22	11,59	15,22	18,30	22,26	24,53	25,58	28,04	29,12	32,49

Factor a: Tipo de mezcla de microorganismos

Nivel a₀: Bactoferm™ LHP (*Pediococcus acidilactici* & *Pediococcus pentosaceus*)

Nivel a₁: Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*)

Nivel a₂: Bactoferm™ F-LC (*Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus* and *Staphylococcus xylosus*)

Nivel a₃: Cultivo lácteo SLB 95₃ (*Lactobacillus bulgaricus* & *Streptococcus thermophilus*)

Factor b: Tiempo de estufaje

Nivel b₀: 16 horas

Nivel b₁: 24 horas

Tabla A-6. Respuesta de evaluación sensorial del tratamiento a_0b_0 (Bactoferm™ LHP – 16 horas estufaje)

Catadores	Color		Olor		Sabor		Aceptabilidad	
	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂
1	3	4	5	4	4	3	4	3
3	5	3	3	3	2	4	4	4
5	4	3	5	2	3	4	3	4
7	2	5	3	3	4	4	4	4
9	3	2	3	4	5	2	5	2
11	3	3	2	4	5	4	5	4
13	4	4	2	6	1	4	2	5

Tabla A-7. Respuesta de evaluación sensorial del tratamiento a_0b_1 (Bactoferm™ LHP – 24 horas estufaje)

Catadores	Color		Olor		Sabor		Aceptabilidad	
	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂
1	4	4	5	3	5	2	5	3
3	4	2	3	4	2	5	5	4
6	3	3	4	3	2	2	3	2
8	3	4	4	5	4	5	4	5
9	4	4	3	3	4	2	4	2
12	3	4	5	4	3	5	4	5
14	3	5	3	2	4	3	4	3

Tabla A-8. Respuesta de evaluación sensorial del tratamiento a_1b_0 (Bactoferm™ F-RM-52 – 16 horas estufaje)

Catadores	Color		Olor		Sabor		Aceptabilidad	
	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂
1	3	3	4	3	3	3	4	3
4	3	2	5	4	4	4	4	4
5	5	2	3	2	2	5	2	5
8	2	3	3	3	4	4	4	4
10	4	4	3	5	4	5	4	4
11	3	2	3	4	4	3	4	3
14	4	3	3	2	3	2	3	2

Tabla A-9. Respuesta de evaluación sensorial del tratamiento a_1b_1 (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje)

Catadores	Color		Olor		Sabor		Aceptabilidad	
	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂
1	3	3	4	3	5	4	5	4
4	3	2	5	4	5	5	5	5
6	5	3	5	2	3	3	2	4
7	2	2	2	4	5	3	5	3
10	3	4	4	4	4	4	5	4
12	4	2	3	3	2	3	2	3
13	4	3	4	4	4	3	3	3

Tabla A-10. Respuesta de evaluación sensorial del tratamiento a_2b_0 (Bactoferm™ F-LC – 16 horas estufaje)

Catadores	Color		Olor		Sabor		Aceptabilidad	
	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂
2	3	4	3	3	4	3	5	3
4	4	2	4	3	3	3	3	3
6	5	2	3	4	1	3	1	3
8	3	3	4	2	2	2	2	1
9	4	3	2	4	3	3	3	3
11	4	2	3	3	2	2	2	2
13	4	3	3	5	1	4	2	4

Tabla A-11. Respuesta de evaluación sensorial del tratamiento a_2b_1 (Bactoferm™ F-LC – 24 horas estufaje)

Catadores	Color		Olor		Sabor		Aceptabilidad	
	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂
2	3	4	2	3	1	4	2	3
4	4	3	5	5	4	5	4	4
5	3	2	4	3	4	4	3	4
7	3	3	3	5	3	4	3	4
9	4	2	3	3	4	4	4	4
12	4	3	4	2	2	2	2	2
14	3	3	4	1	2	4	2	4

Tabla A-12. Respuesta de evaluación sensorial del tratamiento a₃b₀ (Cultivo lácteo SLB 95₃ – 16 horas estufaje)

Catadores	Color		Olor		Sabor		Aceptabilidad	
	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂
2	3	4	2	4	2	3	2	3
3	3	3	4	3	3	3	2	4
6	4	3	3	3	2	4	2	4
7	4	3	2	2	2	2	2	2
10	4	4	3	4	3	4	5	4
11	5	2	5	4	3	3	3	3
14	3	2	4	3	5	2	5	3

Tabla A-13. Respuesta de evaluación sensorial del tratamiento a₃b₁ (Cultivo lácteo SLB 95₃ – 24 horas estufaje)

Catadores	Color		Olor		Sabor		Aceptabilidad	
	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂
2	3	4	2	5	4	3	5	3
3	4	3	5	4	4	2	3	4
5	4	1	4	1	5	3	3	3
8	3	2	3	5	4	4	4	4
10	3	4	4	4	2	4	3	4
12	3	2	3	3	2	4	2	4
13	3	3	2	5	3	4	3	3

Tabla A-14. Análisis microbiológico del tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje) a₁b₁ a 30 días de proceso

PARÁMETRO	Unidad	Resultado	Límite	Norma de Referencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	ufc/g	< 10	1,0x10 ²	NTE INEN 1 338:2010
<i>Clostridium perfringens</i>	ufc/g	< 10	1,0x10 ³	NTE INEN 1 338:2010
Salmonella	ufc/25g	Ausencia	Ausencia	NTE INEN 1 338:2010
<i>Escherichia coli</i> *	NMP/g	< 10	1,0x10 ²	NTE INEN 1 338:2010

* expresado como coliformes fecales

Tabla A-15. Composición proximal del tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje) a₁b₁

PARÁMETRO*	MÉTODO/NORMA	UNIDAD	RESULTADO
Proteína	PEE /LAB-CESTTA/104 AOAC/ Volumétrico	%	14,10
Grasa	PEE /LAB-CESTTA/102 AOAC/ Gravimétrico	%	27,47
Humedad	PEE /LAB-CESTTA/80 AOAC/ Gravimétrico	%	35,98
Cenizas	PEE /LAB-CESTTA/101 AOAC/ Gravimétrico	%	5,95
Carbohidratos totales*	–	%	16,50

* expresados en base fresca

** carbohidratos, fibra dietética

Tabla A-16. Número de colonias del iniciador Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*) en tratamiento a₁b₁

Tiempo [h]	<i>Lactobacillus curvatus</i>			<i>Staphylococcus carnosus</i>
	Dilución			Dilución
	1/10 ²	1/10 ³	1/10 ⁴	1/10 ³
0	230	–	–	120
2	150	–	–	126
5	131	–	–	140
8	133	–	–	159
12	210	–	–	187
15	280	–	–	211
18	–	45	–	250
21	–	59	–	281
23	–	79	–	292
27	–	159	–	296
33	–	309	–	301
39	–	–	46	305
51	–	–	57	307
63	–	–	59	309
82	–	–	60	310
101	–	–	62	316
120	–	–	61	319
139	–	–	63	328
158	–	–	64	330

Tabla A-17. Desarrollo microbiano [ufc/g] del iniciador Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*) en tratamiento a₁b₁

Tiempo [h]	<i>Lactobacillus curvatus</i> [ufc/g]	<i>Lactobacillus curvatus</i> [log ufc/g]	<i>Staphylococcus carnosus</i> [ufc/g]	<i>Staphylococcus carnosus</i> [log ufc/g]
0	2,30 x 10 ⁴	4,3617	1,20 x 10 ⁵	5,0792
2	1,50 x 10 ⁴	4,1761	1,26 x 10 ⁵	5,1004
5	1,30 x 10 ⁴	4,1173	1,40 x 10 ⁵	5,1461
8	1,33 x 10 ⁴	4,1239	1,59 x 10 ⁵	5,2014
12	2,10 x 10 ⁴	4,3222	1,87 x 10 ⁵	5,2718
15	2,80 x 10 ⁴	4,4472	2,11 x 10 ⁵	5,3243
18	4,50 x 10 ⁴	4,6532	2,50 x 10 ⁵	5,3979
21	5,90 x 10 ⁴	4,7709	2,81 x 10 ⁵	5,4487
23	7,90 x 10 ⁴	4,8976	2,92 x 10 ⁵	5,4654
27	1,59 x 10 ⁵	5,2014	2,96 x 10 ⁵	5,4713
33	3,09 x 10 ⁵	5,4900	3,01 x 10 ⁵	5,4786
39	4,60 x 10 ⁵	5,6628	3,05 x 10 ⁵	5,4843
51	5,70 x 10 ⁵	5,7559	3,07 x 10 ⁵	5,4871
63	5,90 x 10 ⁵	5,7709	3,09 x 10 ⁵	5,4900
82	6,00 x 10 ⁵	5,7782	3,10 x 10 ⁵	5,4914
101	6,20 x 10 ⁵	5,7924	3,16 x 10 ⁵	5,4997
120	6,10 x 10 ⁵	5,7853	3,19 x 10 ⁵	5,5038
139	6,30 x 10 ⁵	5,7993	3,28 x 10 ⁵	5,5159
158	6,40 x 10 ⁵	5,8062	3,30 x 10 ⁵	5,5185

Tabla A-18. Porcentaje de rebanabilidad del tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje) a₁b₁

Réplica	Lonchas en buen estado (g)	Lonchas en mal estado (g)	Rebanabilidad (%)	Merma (%)
R ₁	75,0	8,5	89,82	10,18
R ₂	81,8	9,9	89,20	10,80
R ₃	87,3	5,1	94,48	5,52
Promedio			91,17	8,83

ANEXOS B
ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tabla B-1. Análisis de varianza para pH - Suma de cuadrados Tipo III de los tratamientos experimentales a las 24 horas de fermentación

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo de Cultivo Iniciador	1,11645	3	0,37215	250,52	0,0000
B:Tiempo de Estufaje	0,00212	1	0,00212	1,42	0,2716
C:Replica	0,00429	1	0,00429	2,89	0,1330
INTERACCIONES					
AB	0,01724	3	0,00575	3,87	0,0639
RESIDUOS	0,01040	7	0,00149		
TOTAL (CORREGIDO)	1,15050	15			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla B-2. Pruebas de múltiple rangos para pH por factor A (Tipo de Cultivo Iniciador) Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD de los tratamientos experimentales a las 24 horas de fermentación

<i>Tipo de Cultivo Iniciador</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1	4	5,14500	0,0192713	X
3	4	5,25250	0,0192713	X
2	4	5,71575	0,0192713	X
0	4	5,72725	0,0192713	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
0 - 1	*	0,58225	0,0900645
0 - 2		0,01150	0,0900645
0 - 3	*	0,47475	0,0900645
1 - 2	*	-0,57075	0,0900645
1 - 3	*	-0,10750	0,0900645
2 - 3	*	0,46325	0,0900645

* indica una diferencia significativa.

Tabla B-3. Análisis de varianza para Acidez [g ácido láctico/100 g] - Suma de cuadrados Tipo III de los tratamientos experimentales a las 120 horas de maduración

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo de Cultivo Iniciador	0,1412340	3	0,0470780	6,27	0,0215
B:Tiempo de Estufaje	0,0578252	1	0,0578252	7,70	0,0275
C:Replica	0,0427326	1	0,0427326	5,69	0,0485
INTERACCIONES					
AB	0,0446350	3	0,0148783	1,98	0,2056
RESIDUOS	0,0525847	7	0,0075121		
TOTAL (CORREGIDO)	0,3390110	15			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla B-4. Pruebas de múltiple rangos para Acidez [g ácido láctico/100 g] por factor A Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD de los tratamientos experimentales a las 24 horas de maduración

<i>Tipo de Cultivo Iniciador</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
0	4	1,85625	0,0433362	X
3	4	1,86047	0,0433362	X
1	4	1,87875	0,0433362	XX
2	4	2,08125	0,0433362	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
0 - 1		-0,022500	0,202532
0 - 2	*	-0,225000	0,202532
0 - 3		-0,004219	0,202532
1 - 2		-0,202500	0,202532
1 - 3		0,018281	0,202532
2 - 3	*	0,220781	0,202532

* indica una diferencia significativa.

$$DMS = q_{0,05;rmax;(n-1)} \sqrt{\frac{CME}{n}}$$

$$CME = 0,08048$$

$$n = 2$$

$$q_{0,05;8;7} = 5,82$$

$$DMS = 5,82 * \sqrt{\frac{0,08048}{2}}$$

$$DMS = 1,16752$$

Tabla B-8. Análisis de varianza para atributo sensorial Color - Suma de cuadrados Tipo I de los tratamientos experimentales a los 15 días de proceso

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Catadores	3,80804	13	0,292926	1,34	0,2391
B:Tratamientos	2,52083	7	0,360119	1,64	0,1556
RESIDUOS	7,66667	35	0,219048		
TOTAL (CORREGIDO)	13,9955	55			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla B-9. Análisis de varianza para atributo sensorial Olor - Suma de cuadrados Tipo I de los tratamientos experimentales a los 15 días de proceso

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tratamientos	1,13839	7	0,162628	0,51	0,8226
B:Catadores	11,2812	13	0,867788	2,71	0,0095
RESIDUOS	11,2188	35	0,320536		
TOTAL (CORREGIDO)	23,6384	55			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla B-10. Análisis de varianza para atributo sensorial Sabor - Suma de cuadrados Tipo I de los tratamientos experimentales a los 15 días de proceso

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tratamientos	7,35714	7	1,05102	2,58	0,0297
B:Catadores	9,08631	13	0,698947	1,71	0,1014
RESIDUOS	14,2708	35	0,407738		
TOTAL (CORREGIDO)	30,7143	55			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla B-11. Pruebas de múltiple rangos para Sabor por tratamientos

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Tratamientos experimentales</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
5	7	2,5089	0,258346	X
7	7	3,0506	0,258346	XX
3	7	3,2798	0,258346	XX
6	7	3,3006	0,258346	XX
8	7	3,4673	0,258346	XX
1	7	3,4881	0,258346	XX
2	7	3,6131	0,258346	XX
4	7	3,8631	0,258346	X

Tabla B-12. Análisis de varianza para atributo sensorial Aceptabilidad - Suma de Cuadrados Tipo I de los tratamientos experimentales a los 8 días de proceso

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tratamientos	8,03125	7	1,14732	2,35	0,0443
B:Catadores	8,29464	13	0,638049	1,31	0,2543
RESIDUOS	17,0625	35	0,4875		
TOTAL (CORREGIDO)	33,3884	55			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla B-13. Pruebas de Múltiple Rangos para Aceptabilidad por Tratamientos

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Tratamientos experimentales</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
5	7	2,64881	0,282487	X
7	7	3,14881	0,282487	XX
6	7	3,23214	0,282487	XX
3	7	3,35714	0,282487	XX
8	7	3,39881	0,282487	XX
4	7	3,81548	0,282487	X
1	7	3,81548	0,282487	X
2	7	3,94048	0,282487	X

ANEXOS C

GRÁFICOS

Gráfico C-1. Curva de pH vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ LHP – 16 horas estufaje) a_0b_0

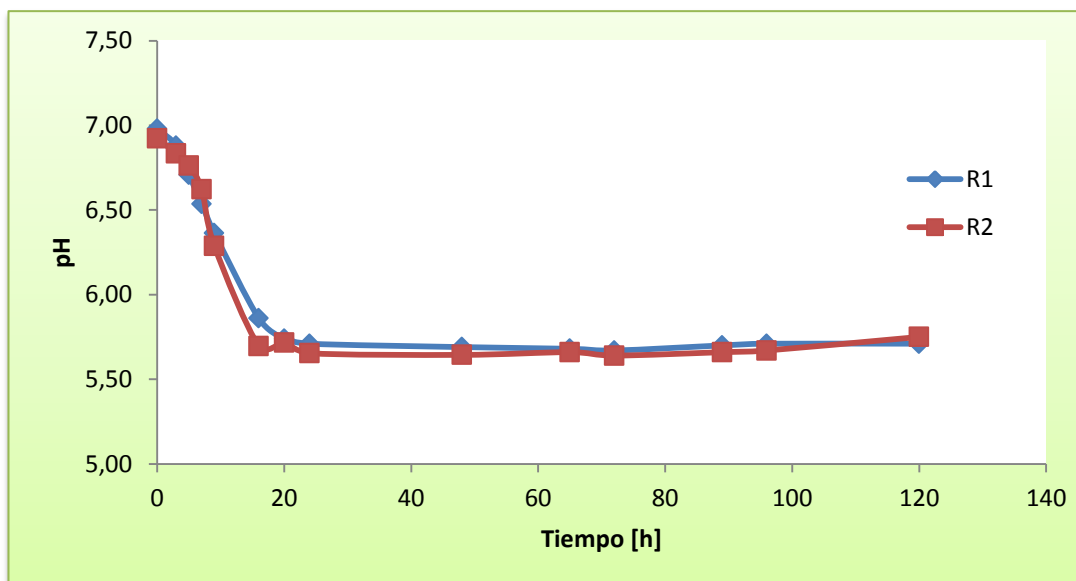


Gráfico C-2. Curva de pH vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ LHP – 24 horas estufaje) a_0b_1

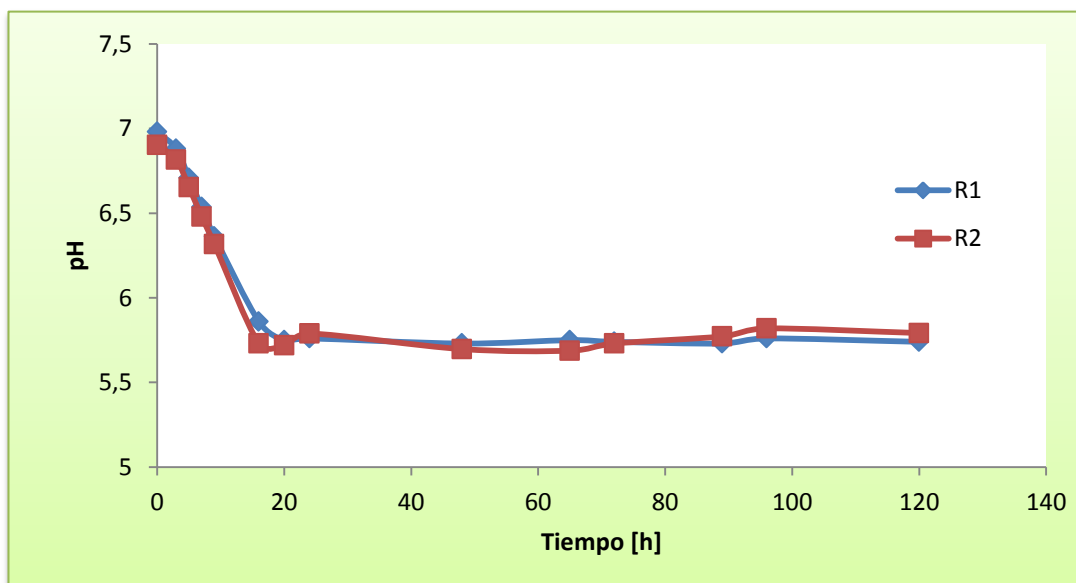


Gráfico C-3. Curva de pH vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 16 horas estufaje) a_1b_0

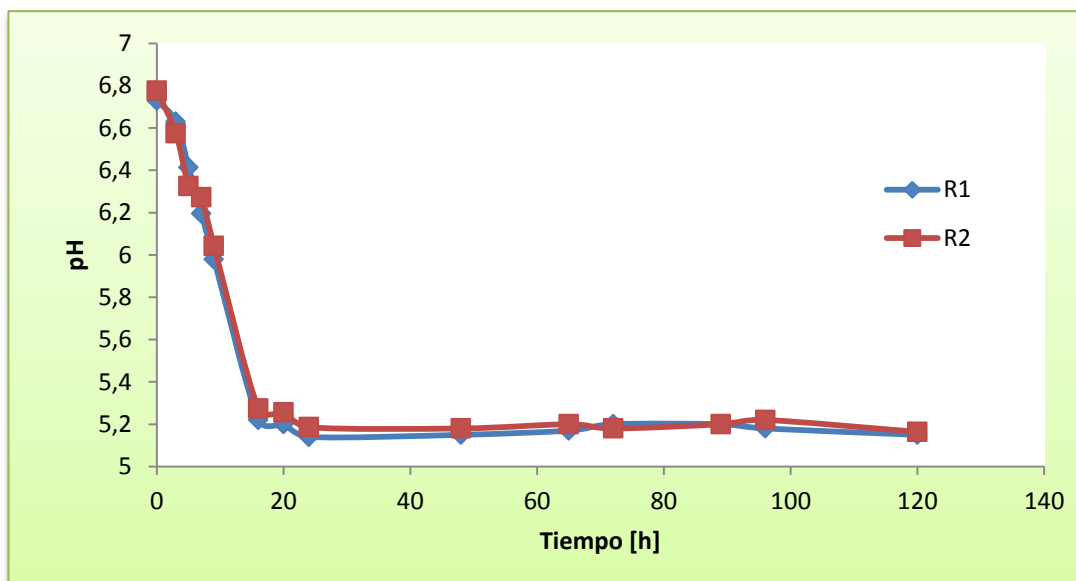


Gráfico C-4. Curva de pH vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje) a_1b_1

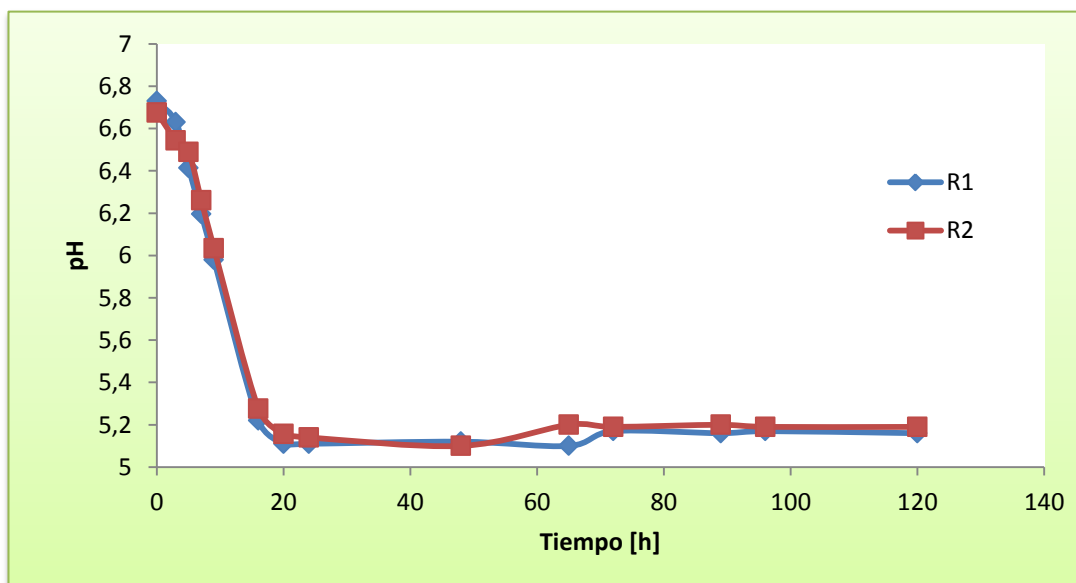


Gráfico C-5. Curva de pH vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-LC – 16 horas estufaje) a_2b_0

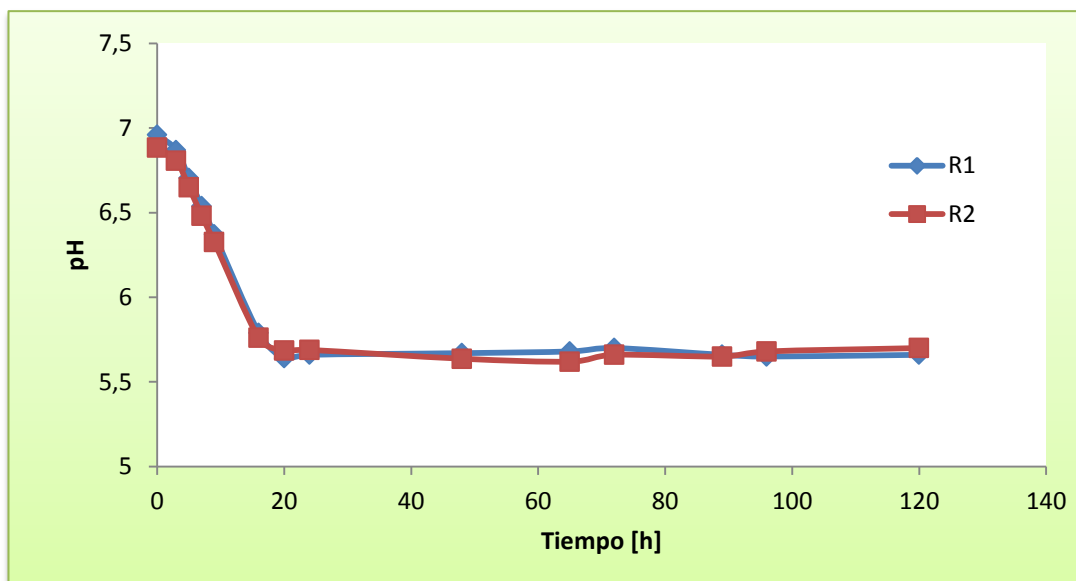


Gráfico C-6. Curva de pH vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-LC – 24 horas estufaje) a_2b_1

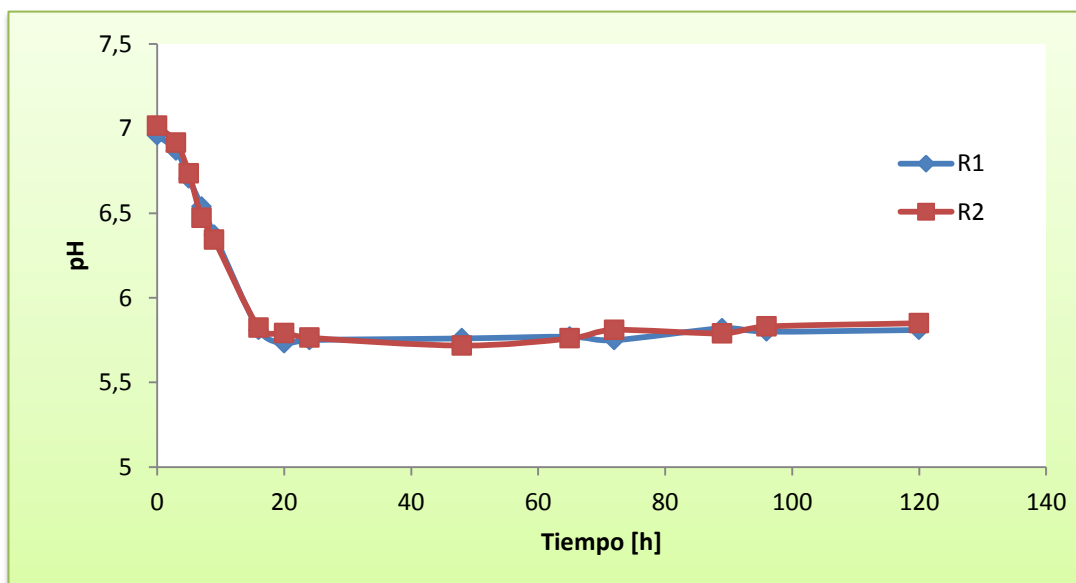


Gráfico C-7. Curva de pH vs Tiempo [h] en tratamiento (Cultivo lácteo SLB 95₃ – 16 horas estufaje) a₃b₀

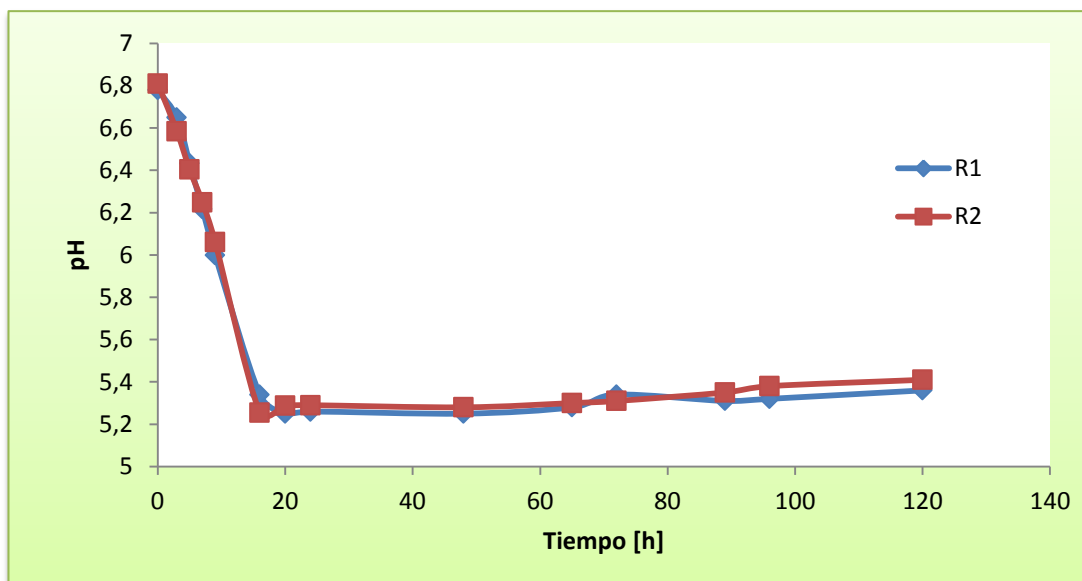


Gráfico C-8. Curva de pH vs Tiempo [h] en tratamiento (Cultivo lácteo SLB 95₃ – 24 horas estufaje) a₃b₁

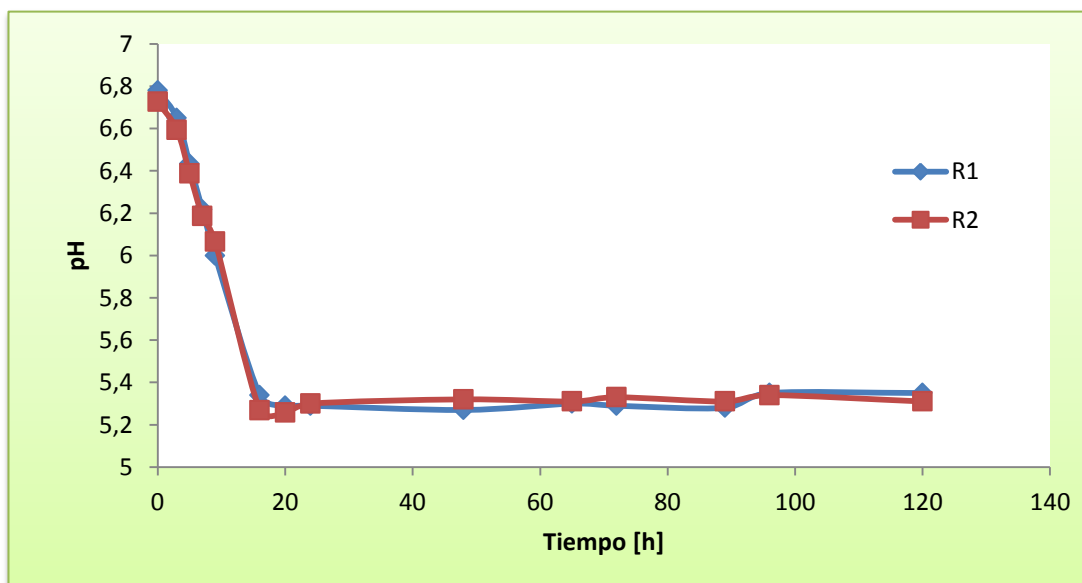


Gráfico C-9. Curva de Acidez [g ácido láctico/100 g] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ LHP – 16 horas estufaje) a_0b_0

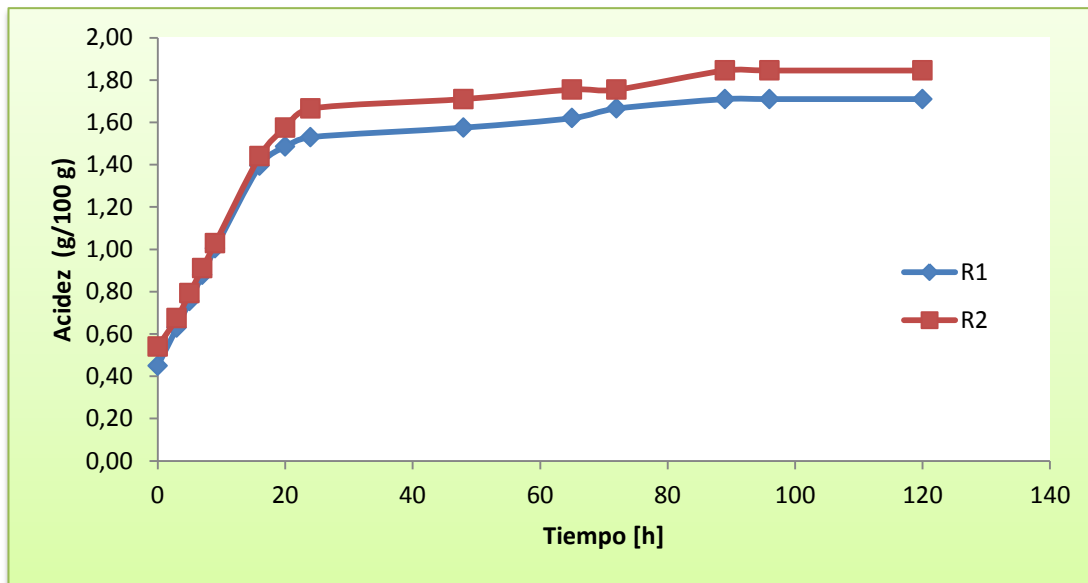


Gráfico C-10. Curva de Acidez [g ácido láctico/100 g] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ LHP – 24 horas estufaje) a_0b_1

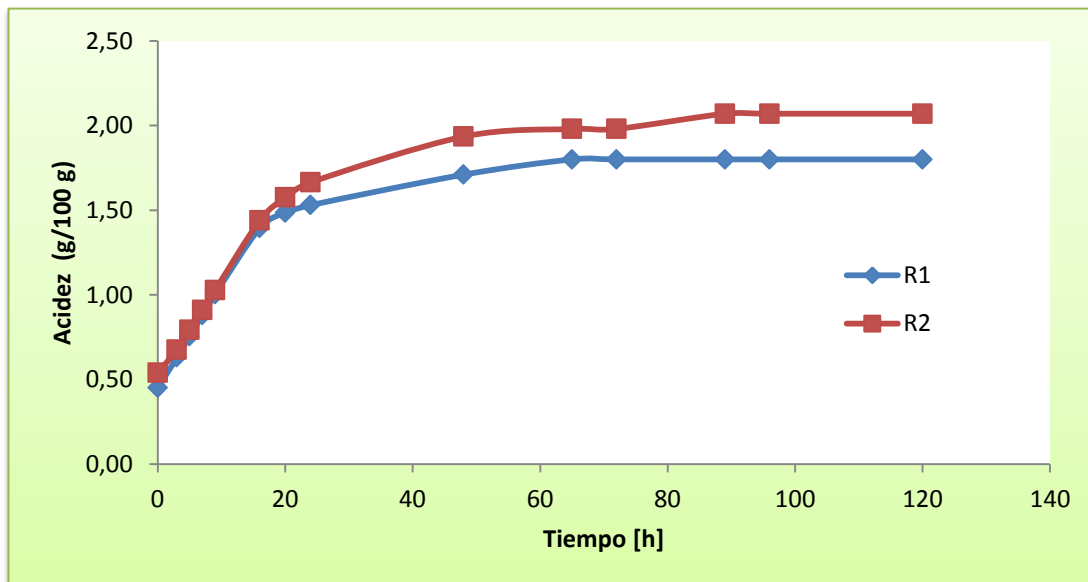


Gráfico C-11. Curva de Acidez [g ácido láctico/100 g] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 16 horas estufaje) a₁b₀

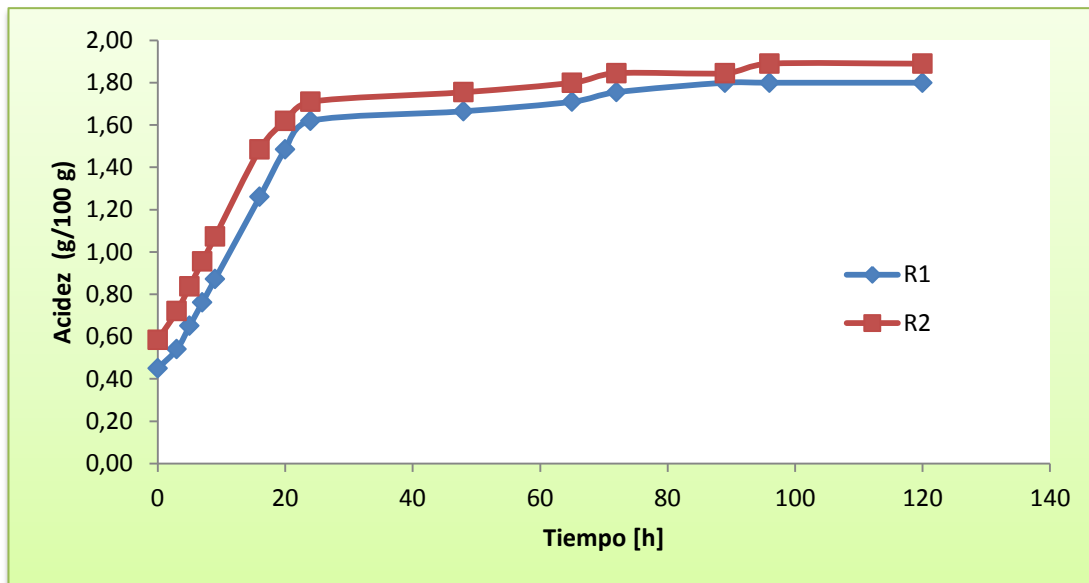


Gráfico C-12. Curva de Acidez [g ácido láctico/100 g] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje) a₁b₁

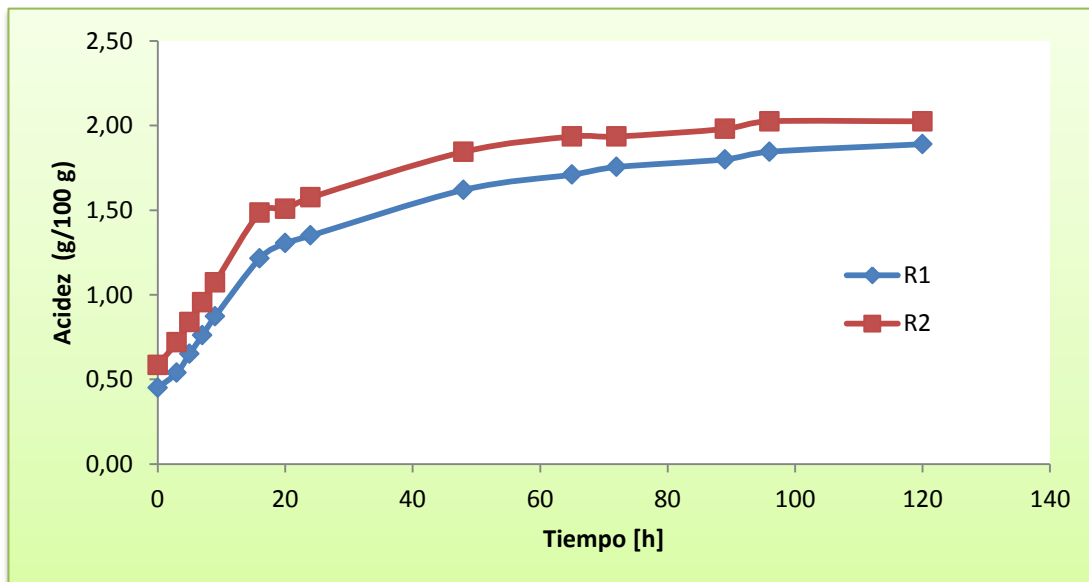


Gráfico C-13. Curva de Acidez [g ácido láctico/100 g] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-LC – 16 horas estufaje) a_{2b_0}

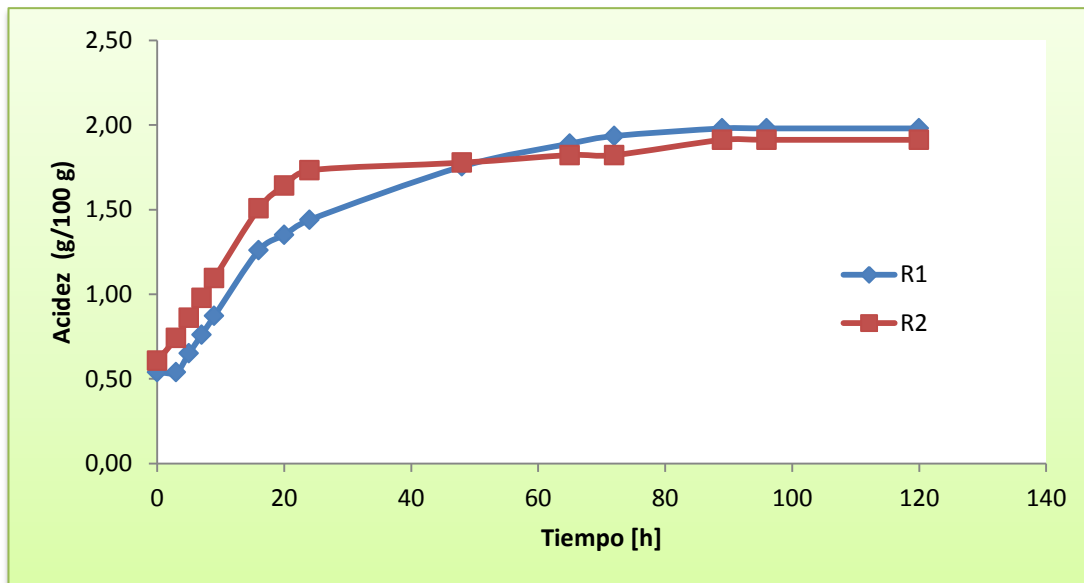


Gráfico C-14. Curva de Acidez [g ácido láctico/100 g] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-LC – 24 horas estufaje) a_{2b_1}

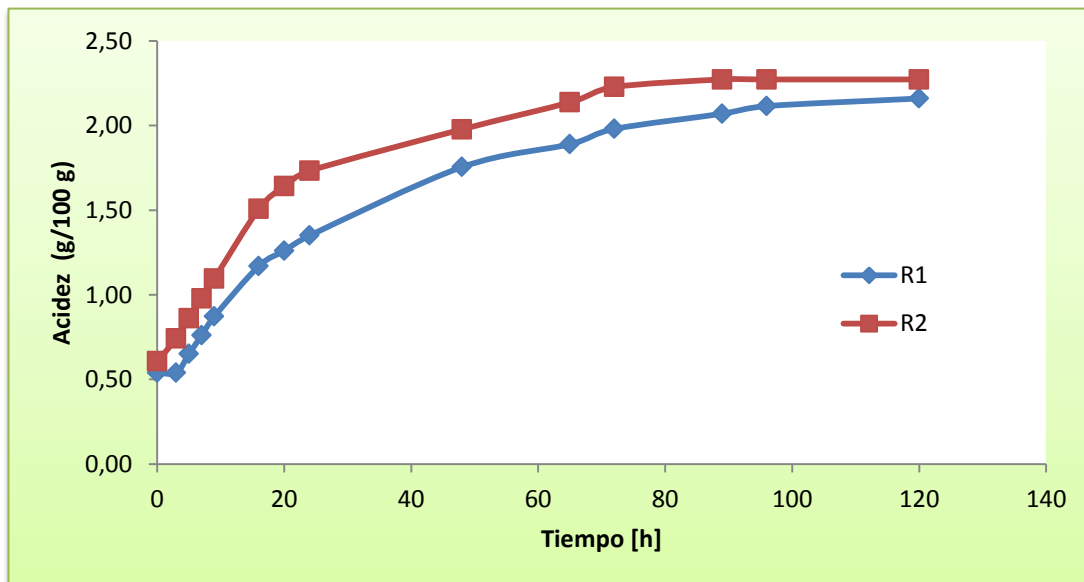


Gráfico C-15. Curva de Acidez [g ácido láctico/100 g] vs Tiempo [h] en tratamiento (Cultivo lácteo SLB 95₃ – 16 horas estufaje) a₃b₀

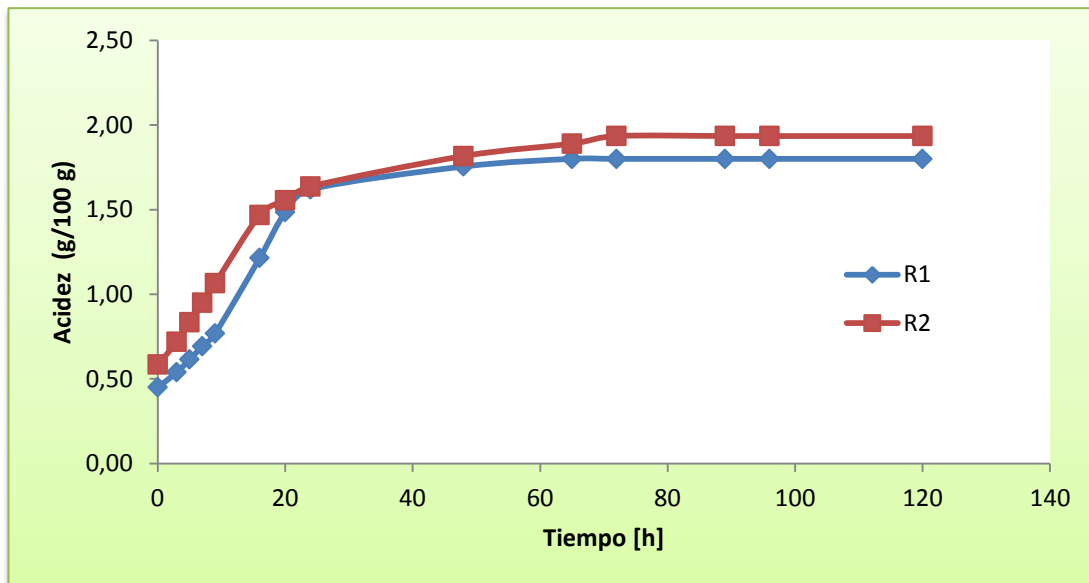


Gráfico C-16. Curva de Acidez [g ácido láctico/100 g] vs Tiempo [h] en tratamiento (Cultivo lácteo SLB 95₃ – 24 horas estufaje) a₃b₁

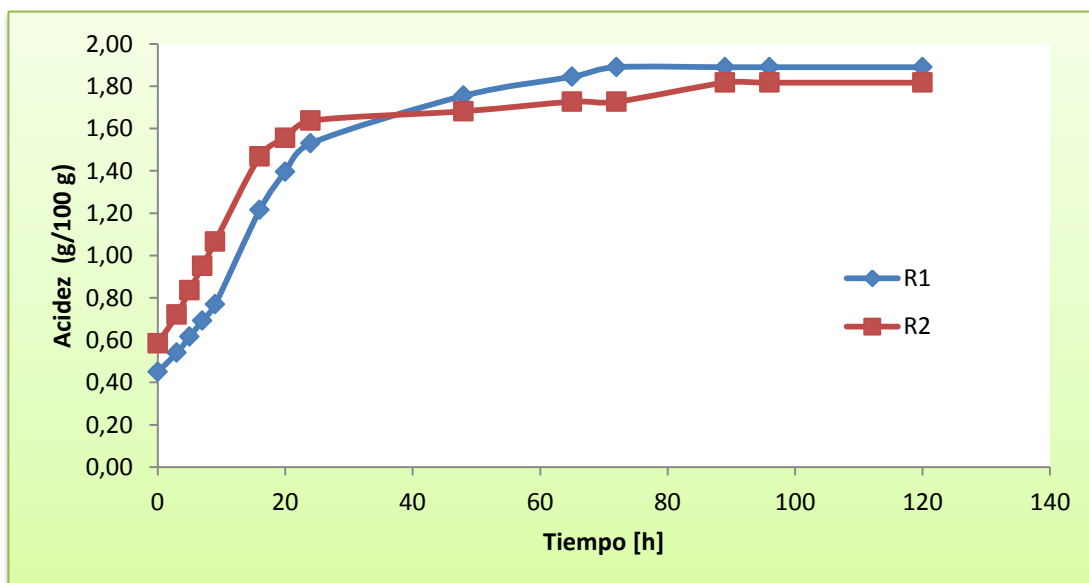


Gráfico C-17. Curva de Pérdida de peso [%] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ LHP – 16 horas estufaje) a_0b_0

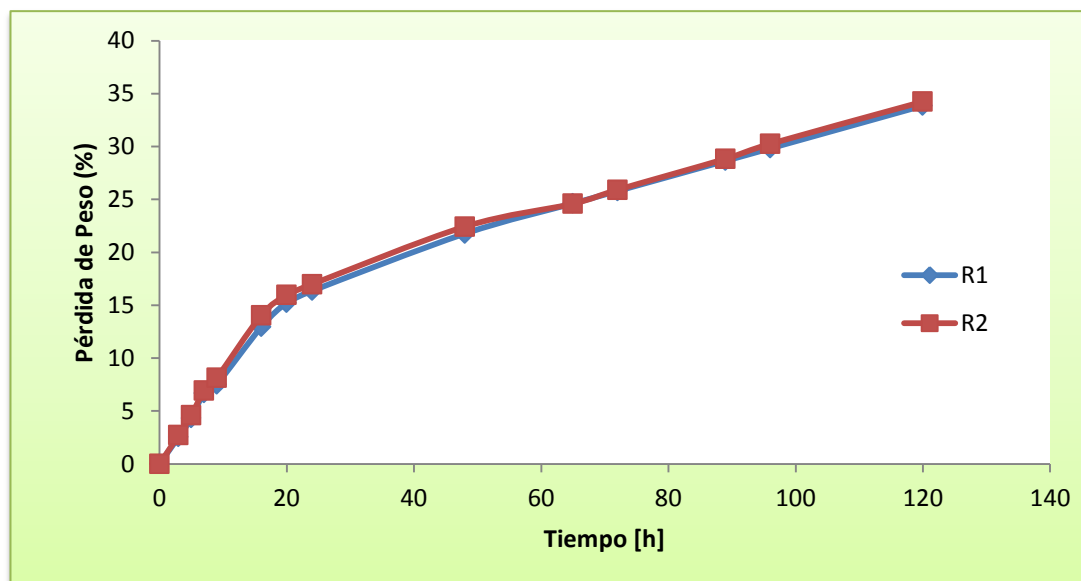


Gráfico C-18. Curva de Pérdida de peso [%] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ LHP – 24 horas estufaje) a_0b_1

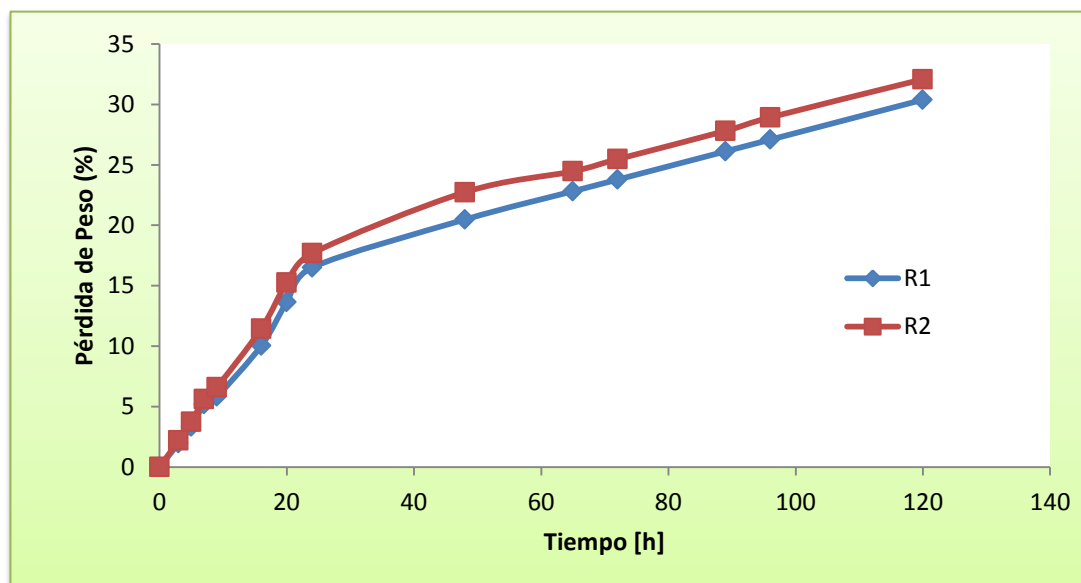


Gráfico C-19. Curva de Pérdida de peso [%] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 16 horas estufaje) a_1b_0

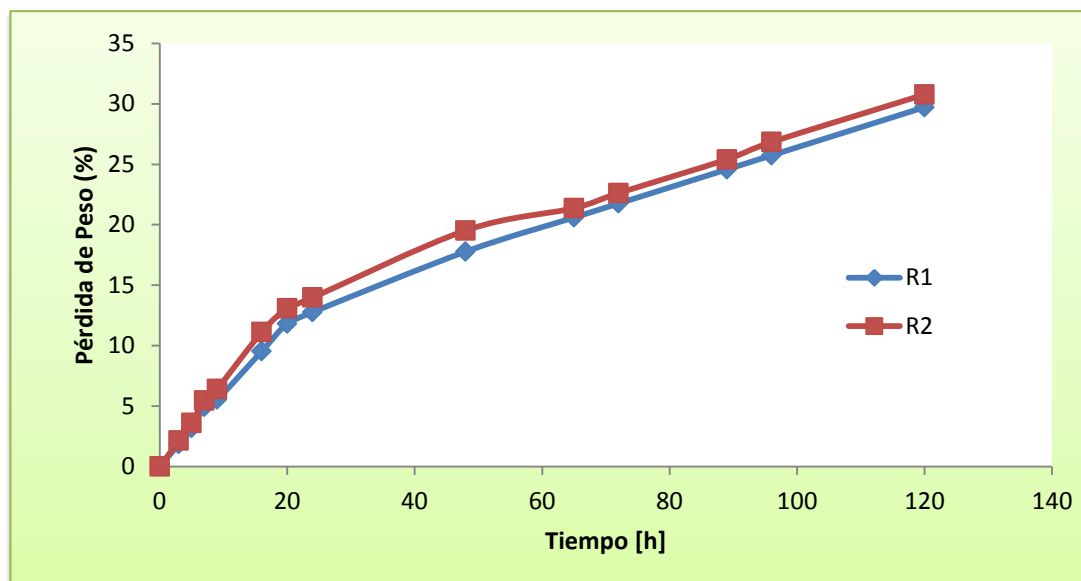


Gráfico C-20. Curva de Pérdida de peso [%] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje) a_1b_1

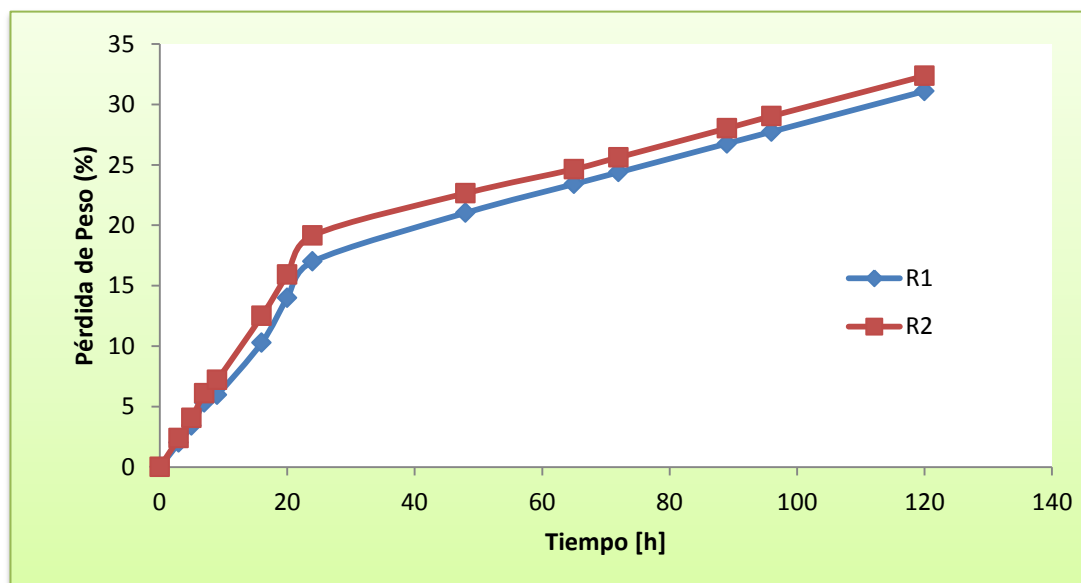


Gráfico C-21. Curva de Pérdida de peso [%] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-LC – 16 horas estufaje) a_{2b_0}

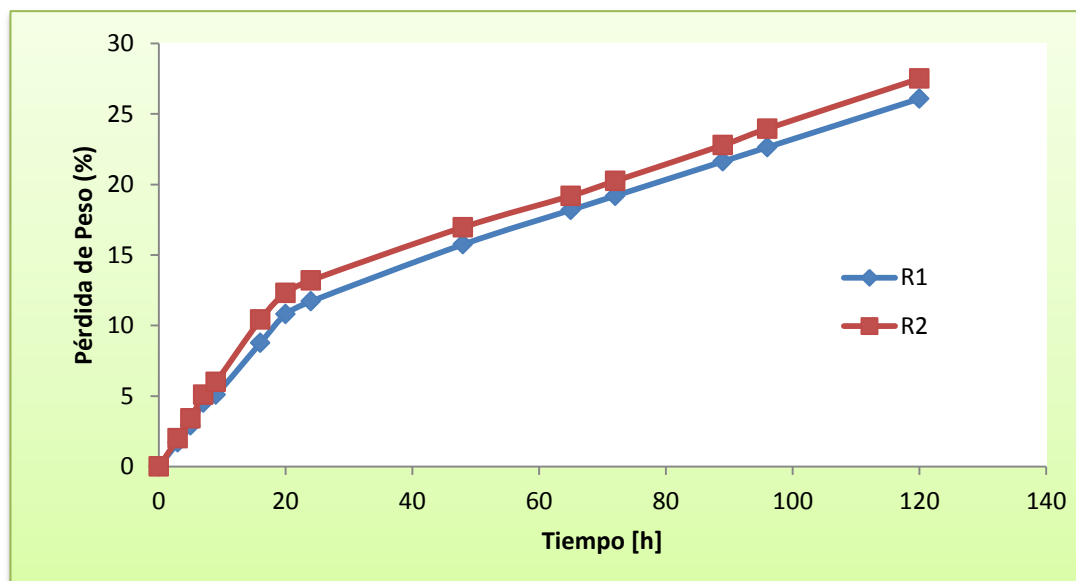


Gráfico C-22. Curva de Pérdida de peso [%] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-LC – 24 horas estufaje) a_{2b_1}

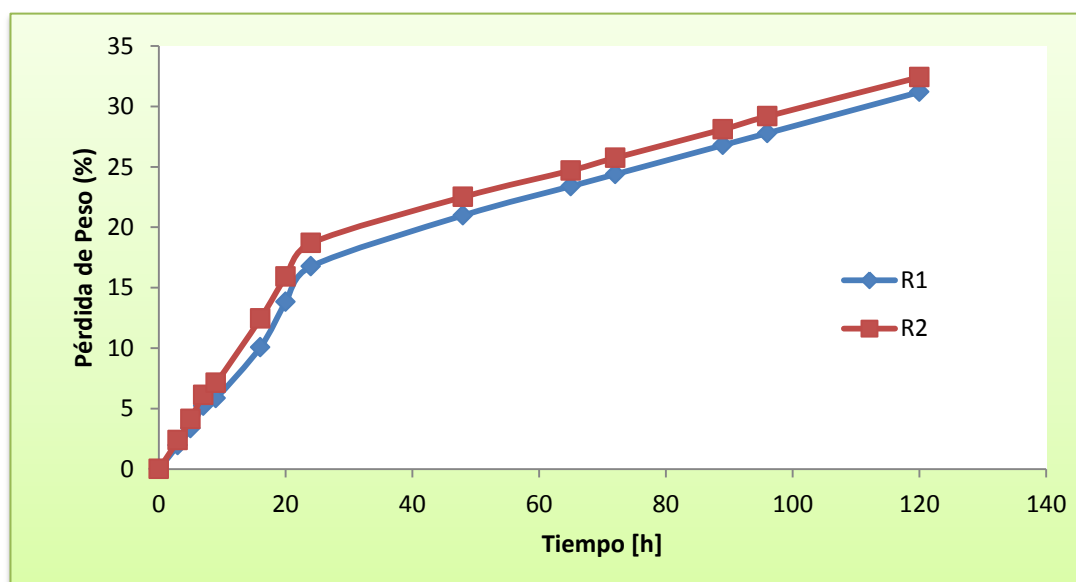


Gráfico C-23. Curva de Pérdida de peso [%] vs Tiempo [h] en tratamiento (Cultivo lácteo SLB 95₃ – 16 horas estufaje) a₃b₀

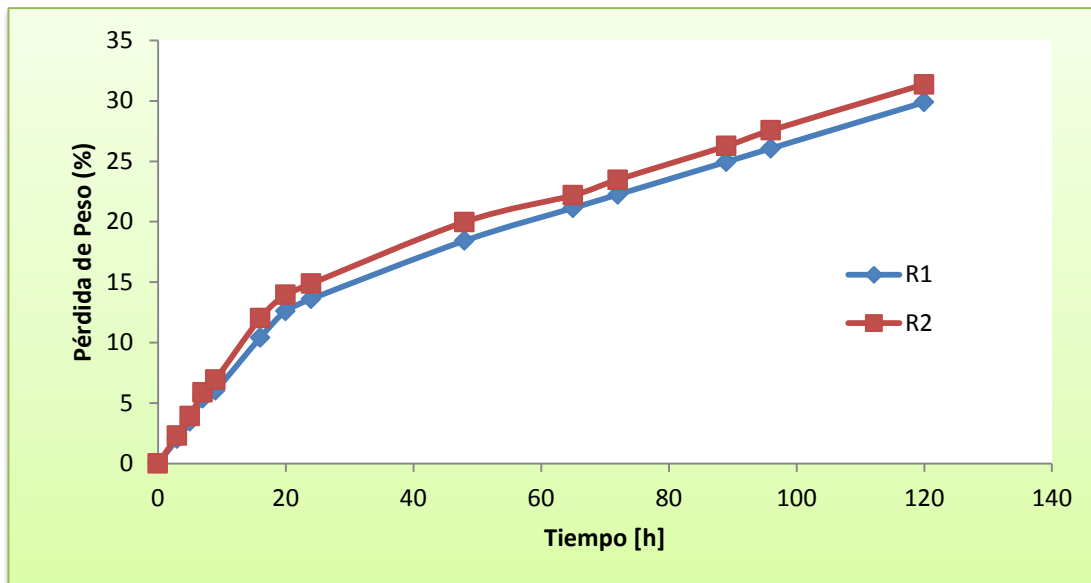


Gráfico C-24. Curva de Pérdida de peso [%] vs Tiempo [h] en tratamiento (Cultivo lácteo SLB 95₃ – 24 horas estufaje) a₃b₁

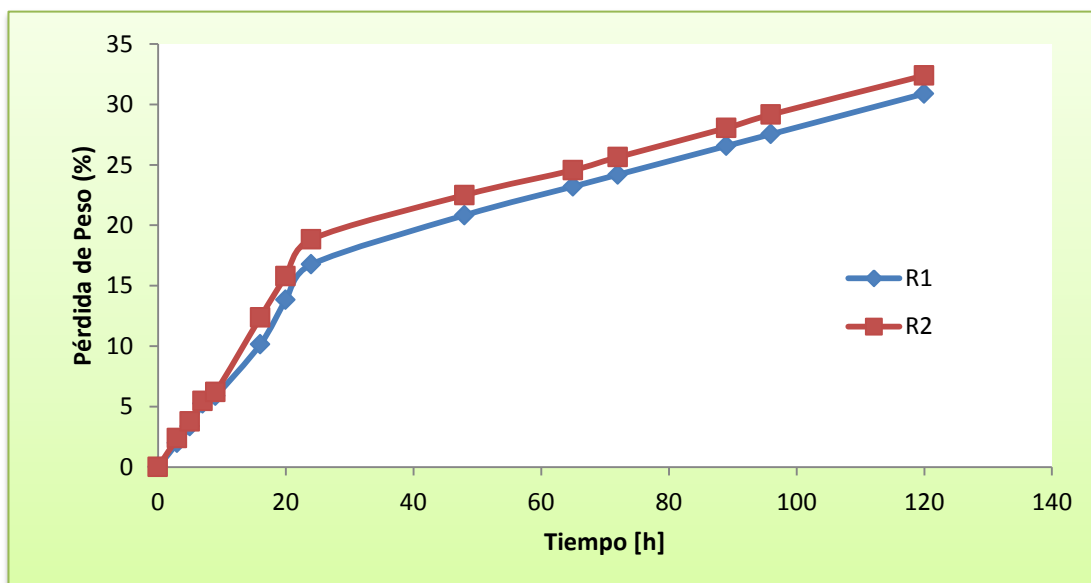
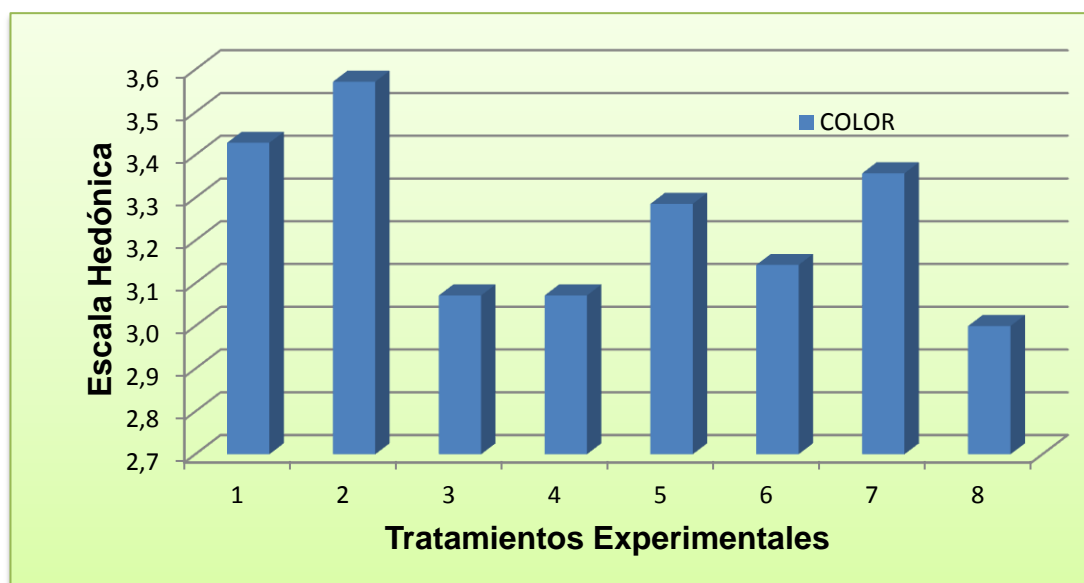
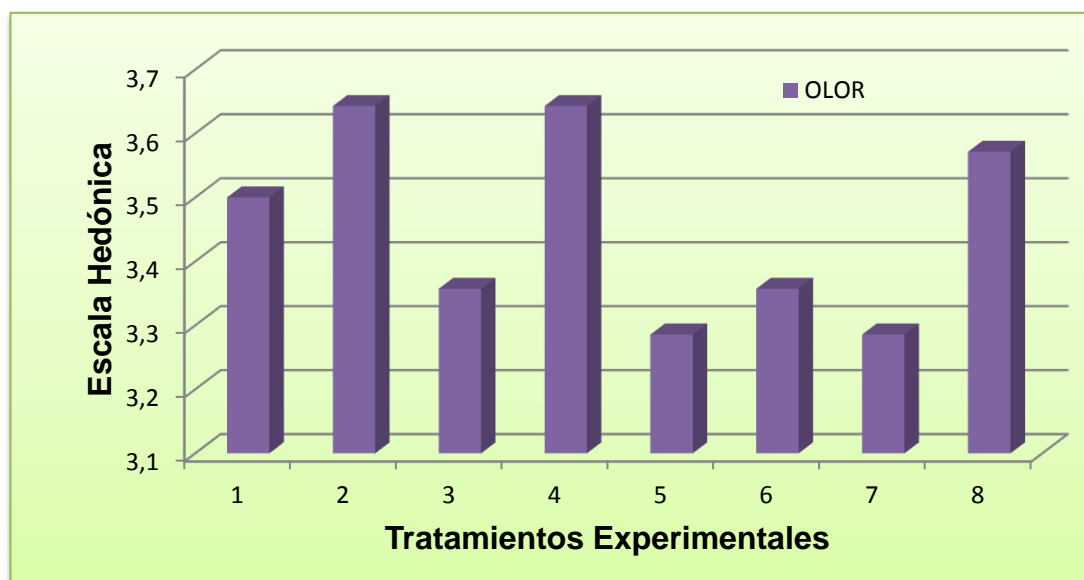


Gráfico C-25. Promedio de evaluación sensorial del atributo Color de los tratamientos experimentales



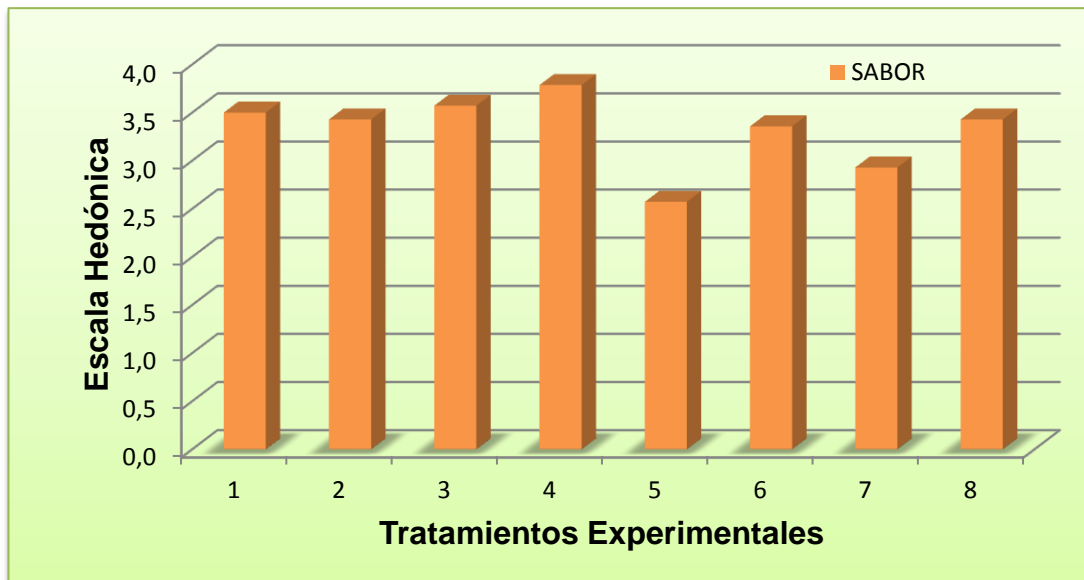
donde: 1 = a_0b_0 , 2 = a_1b_1 , 3 = a_1b_0 , 4 = a_1b_1 , 5 = a_2b_0 , 6 = a_2b_1 , 7 = a_3b_0 , 8 = a_3b_1

Gráfico C-26. Promedio de evaluación sensorial del atributo Olor de los tratamientos experimentales



donde: 1 = a_0b_0 , 2 = a_1b_1 , 3 = a_1b_0 , 4 = a_1b_1 , 5 = a_2b_0 , 6 = a_2b_1 , 7 = a_3b_0 , 8 = a_3b_1

Gráfico C-27. Promedio de evaluación sensorial del atributo Sabor de los tratamientos experimentales



donde: 1 = a_0b_0 , 2 = a_1b_1 , 3 = a_1b_0 , 4 = a_1b_1 , 5 = a_2b_0 , 6 = a_2b_1 , 7 = a_3b_0 , 8 = a_3b_1

Gráfico C-28. Promedio de evaluación sensorial del atributo Aceptabilidad de los tratamientos experimentales



donde: 1 = a_0b_0 , 2 = a_1b_1 , 3 = a_1b_0 , 4 = a_1b_1 , 5 = a_2b_0 , 6 = a_2b_1 , 7 = a_3b_0 , 8 = a_3b_1

Gráfico C-29. Zona lineal de Pérdida de peso [%] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje) a₁b₁

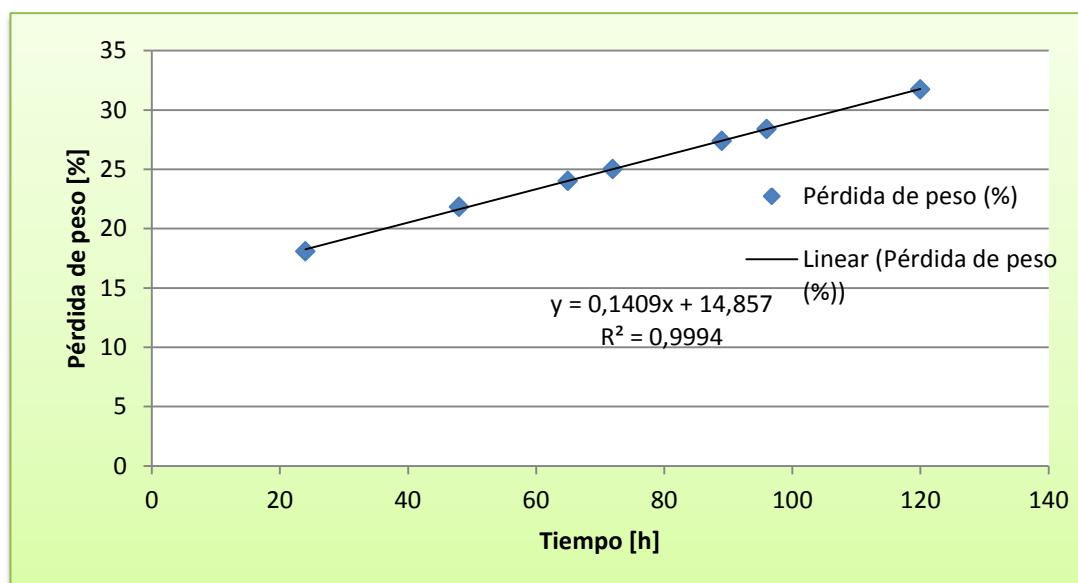


Gráfico C-30. Curva de crecimiento de *Staphylococcus carnosus* [\log_{10} ufc/g] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje) a₁b₁

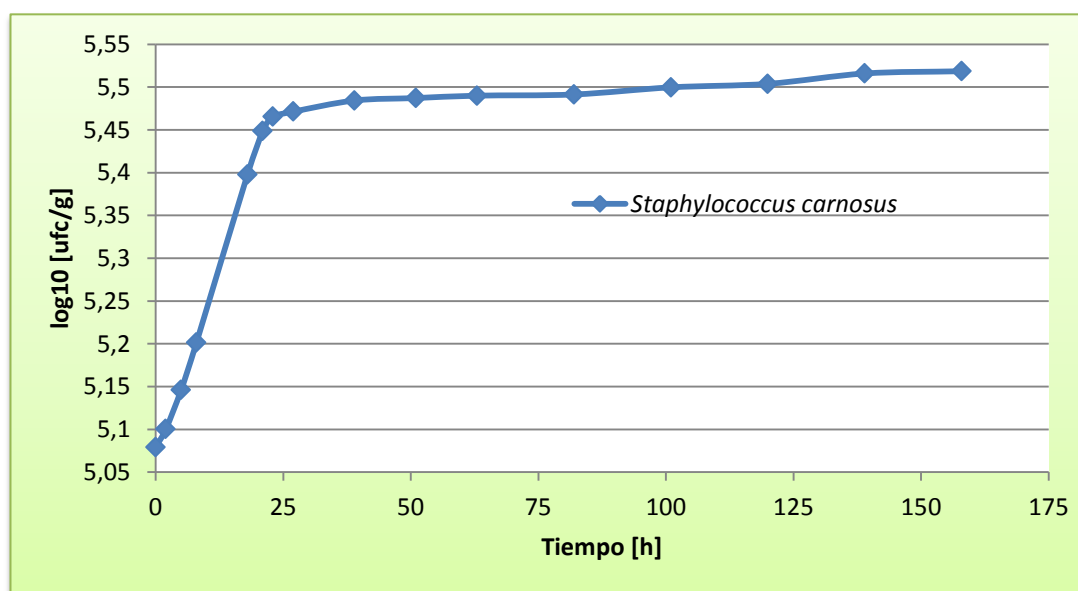


Gráfico C-31. Curva de crecimiento de *Staphylococcus carnosus* [ufc/g] vs Tiempo [h] en escala semilogarítmica en tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje) a₁b₁

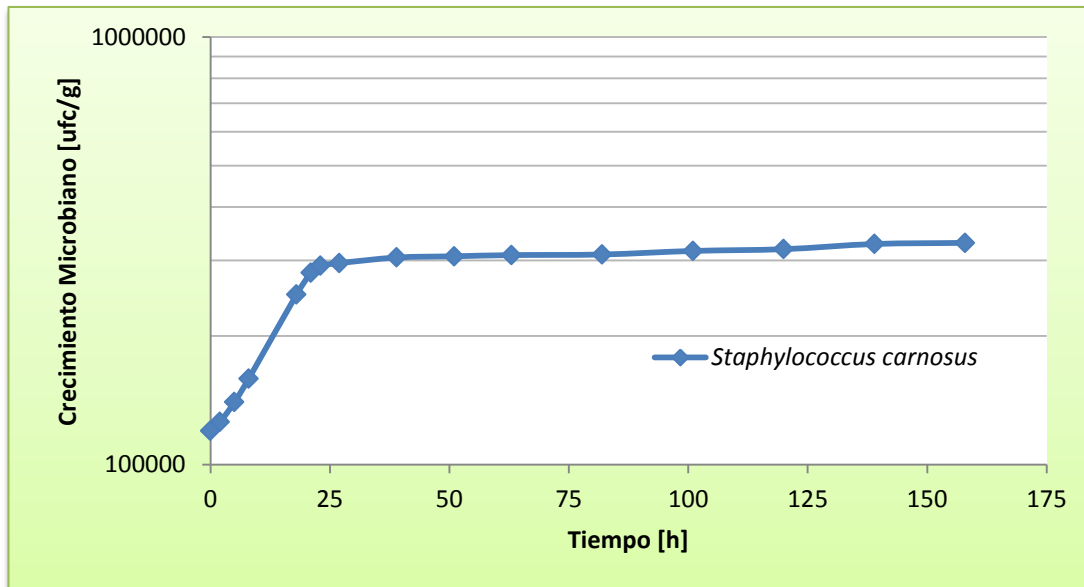


Gráfico C-32. Logaritmo de base 10 de zona de crecimiento DE *Staphylococcus carnosus* [\log_{10} ufc/g] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje) a₁b₁

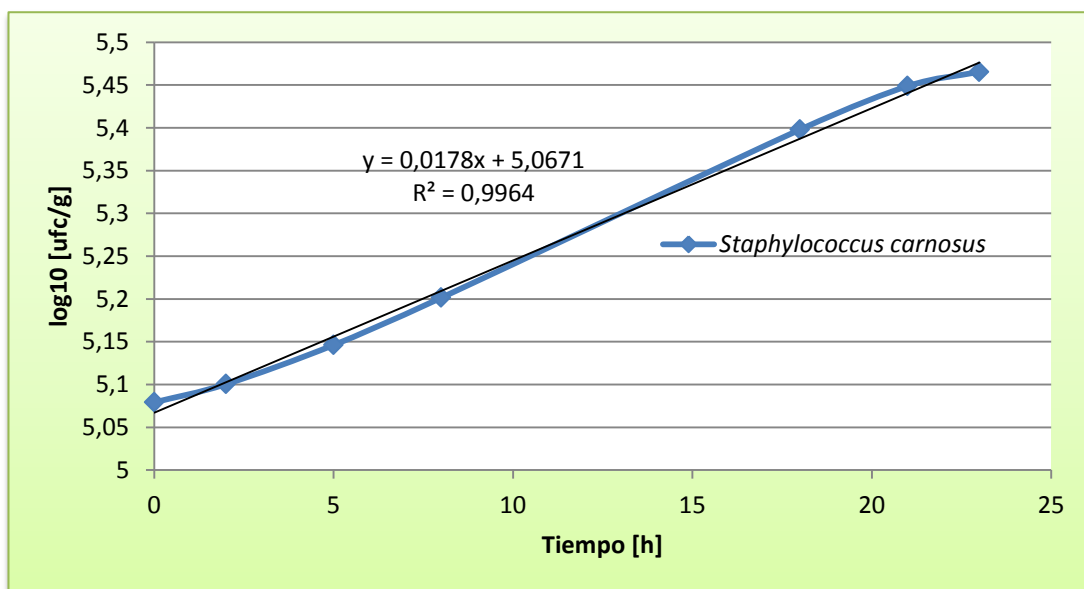


Gráfico C-33. Zona de crecimiento de *Staphylococcus carnosus* [ufc/g] vs Tiempo [h] en escala semilogarítmica en tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje) a₁b₁

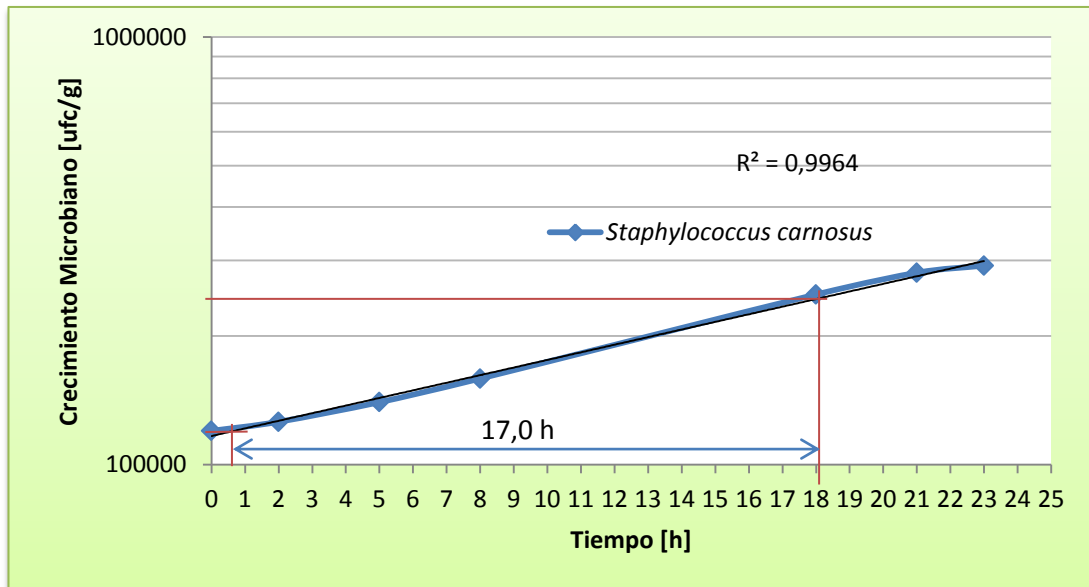


Gráfico C-34. Curva de crecimiento de *Lactobacillus curvatus* [\log_{10} ufc/g] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje) a₁b₁

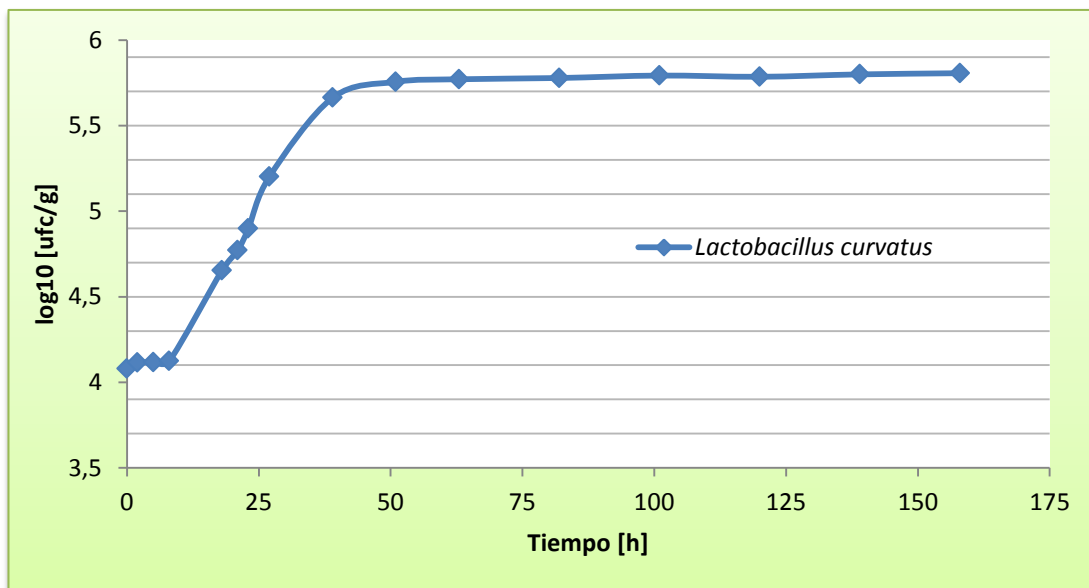


Gráfico C-35. Curva de crecimiento de *Lactobacillus curvatus* [ufc/g] vs Tiempo [h] en escala semilogarítmica en tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje) a₁b₁

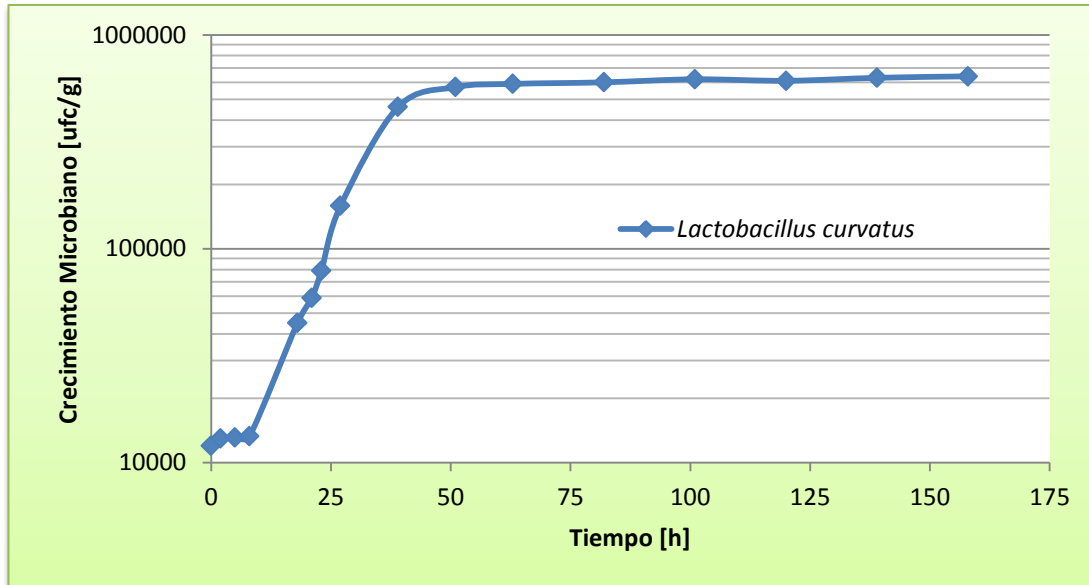


Gráfico C-36. Logaritmo de base 10 de zona de crecimiento de *Lactobacillus curvatus* [\log_{10} ufc/g] vs Tiempo [h] en tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje) a₁b₁

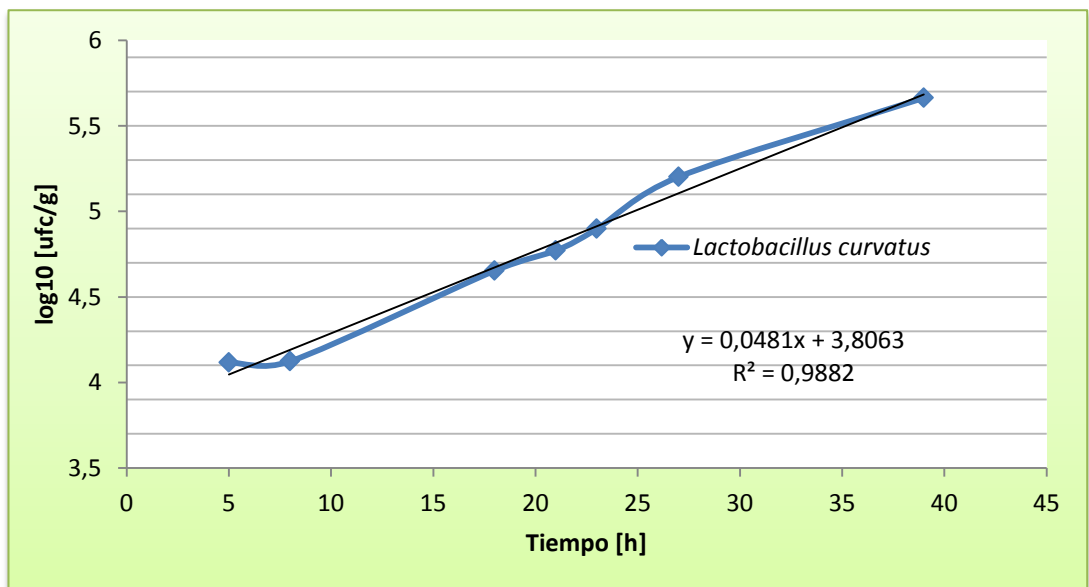
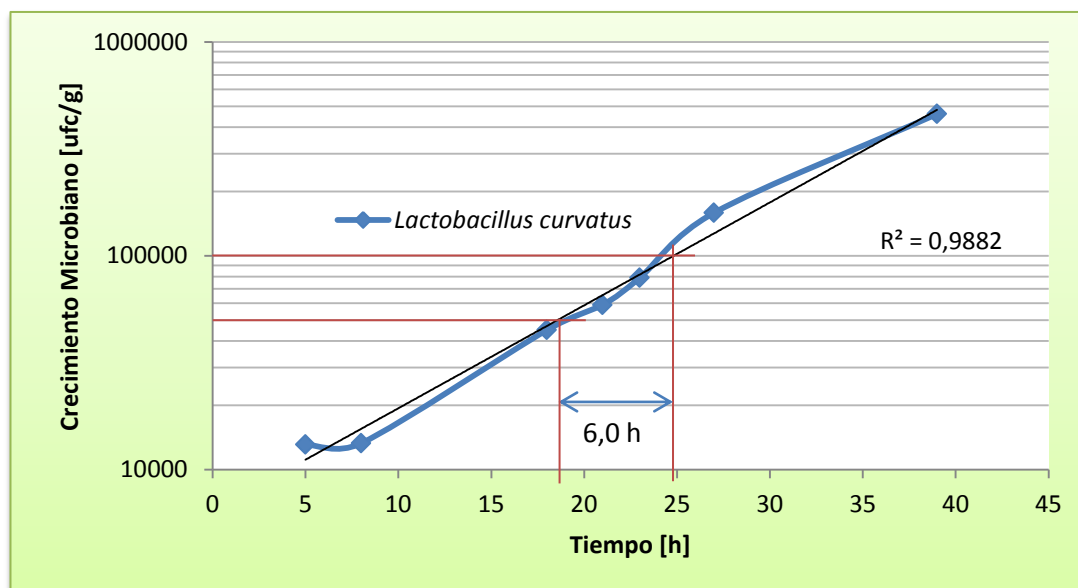


Gráfico C-37. Zona de crecimiento de *Lactobacillus curvatus* [\log_2 ufc/g] vs Tiempo [h] en escala semilogarítmica en tratamiento (Bactoferm™ F-RM-52 – 24 horas estufaje) a_1, b_1



ANEXOS D
FOTOGRAFÍAS

Fotografía D-1. Molino industrial de carne



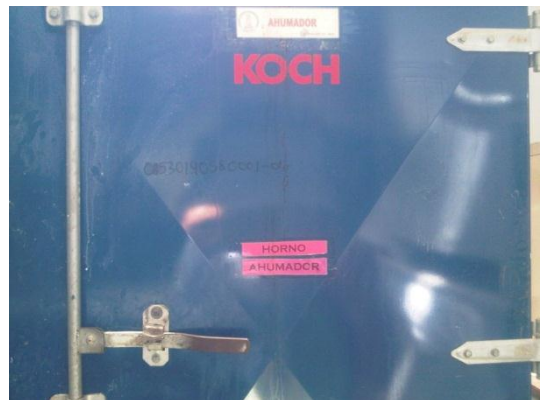
Fotografía D-2. Embutidora manual de carne



Fotografía D-3. Cámara de maduración



Fotografía D-4. Horno ahumador industrial marca Koch



Fotografía D-5. Tratamientos experimentales a cero horas de proceso



Fotografía D-6. Curado de tratamientos experimentales a 24 horas de proceso



Fotografía D-7. Tratamientos experimentales en cámara de maduración a las 72 horas



Fotografía D-8. Tratamientos experimentales a las 96 horas de proceso



Fotografía D-9. Presencia de hongos filamentosos en la superficie de tratamientos experimentales a 120 horas



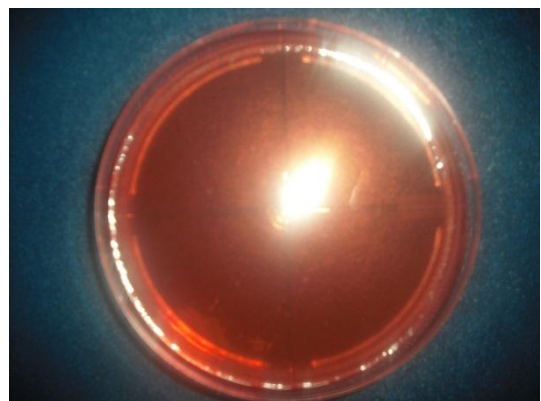
Fotografía D-10. Colonias de *Lactobacillus curvatus* en medio Agar Rogosa Man dilución $1/10^4$ en tratamiento a₁b₁



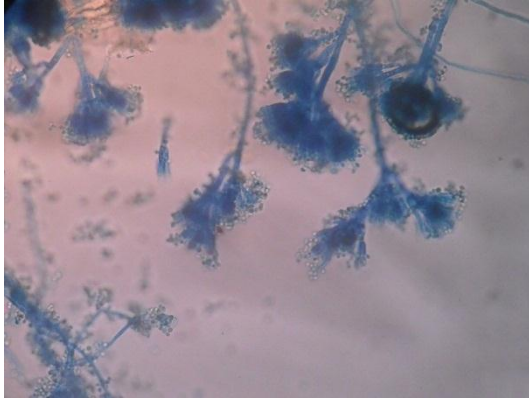
Fotografía D-12. Colonias de *Staphylococcus carnosus* en medio de cultivo Agar Baird Parker dilución $1/10^3$ en tratamiento a₁b₁



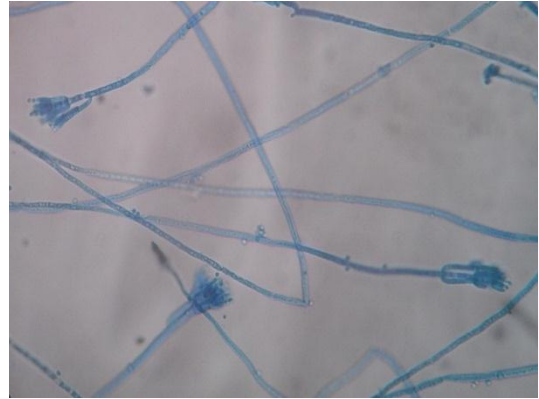
Fotografía D-11. Ausencia de colonias de *Staphylococcus aureus* en medio Agar Manitol Sal Rojo Congo dilución $1/10$ en tratamiento a₁b₁



Fotografía D-13. Observación microscópica de micelios e hifas de *Penicillium* sp. desarrollado en la superficie del producto elaborado (400x)



Fotografía D-14. Observación microscópica de micelios e hifas de *Penicillium* sp. desarrollado en la superficie del producto elaborado (400x)



ANEXOS E

FICHA TÉCNICA DE ANÁLISIS SENSORIAL

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
HOJA DE CATACIÓN

Fecha:.....

INSTRUCCIONES: En el orden que se le solicite deguste y marque a su parecer con una X en el casillero que considere correcta la respuesta:

“El Uso de Bactoferm™ LHP (*Pediococcus acidilactici* & *Pediococcus pentosaceus*), Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*), Bactoferm™ F-LC (*Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus* and *Staphylococcus xylosus*) y Cultivo lácteo SLB 95₃ (*Lactobacillus bulgaricus* & *Streptococcus thermophilus*) en la Elaboración de Chorizo (tipo Ambateño) Madurado”

Característica Organoléptica	
Color (Rojo)	Bastante intenso				
	Muy intenso				
	Intenso				
	Poco intenso				
	Nada intenso				
Olor	Bastante perceptible				
	Muy perceptible				
	Perceptible				
	Poco perceptible				
	Nada perceptible				
Sabor	Bastante agradable				
	Muy agradable				
	Agradable				
	Poco agradable				
	Nada agradable				
Aceptabilidad	Bastante aceptable				
	Muy aceptable				
	Aceptable				
	Poco aceptable				
	Nada aceptable				

Gracias por su Colaboración.

Sugerencias:.....

ANEXOS F
PROTOCOLOS DE ANÁLISIS

ANEXO F-1

DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE PÉRDIDA DE PESO

La pérdida de peso (%PP) se da debido, principalmente, por la eliminación de agua durante el período de secado del chorizo.

MATERIALES

- Muestras de chorizo madurado
- Balanza analítica

PROCEDIMIENTO

- Ubicar una muestra en la cámara de maduración, sobre la cual se aplicara el análisis durante el período que se mantenga dentro de la cámara.
- Extraer la muestra de la cámara de maduración.
- Pesar la muestra en la balanza analítica según el período de tiempo determinado.
- Registrar los pesos marcado en la balanza analítica.
- Determinar el porcentaje de peso que perdió la muestra mediante la siguiente ecuación

$$\%PP = \frac{W_o - W_i}{W_o} \times 100\%$$

Dónde:

%PP = Porcentaje de pérdida de peso

W_o = Peso inicial

W_i = Peso registrado

ANEXO F-2

DETERMINACIÓN DE ACIDEZ TITULABLE Expresado como porcentaje de Ácido Láctico

Al utilizar bacterias productoras de ácido láctico como cultivos iniciadores para la elaboración de chorizo madurado, se consideró expresar el valor de acidez como porcentaje de ácido láctico.

MATERIALES

- Muestra de chorizo madurado
- Vasos de precipitación de 250 ml
- Matraz de aforo de 250 ml
- Bureta graduada de 50 ml
- Probetas de 50 ml
- Balanza analítica

REACTIVOS

- Solución de Hidróxido de Sodio (NaOH) 0.1 N
- Fenolftaleína
- Agua destilada

PROCEDIMIENTO

- Pesar 10 g de muestra en la balanza analítica.
- Colocar la muestra en un vaso de precipitación, añadir 100 ml de agua destilada y dejar en reposo durante 30 min.
- El contenido del vaso de precipitación se transfiere a un matraz aforado de 250 ml, se afora, se agita y se filtra.
- Del filtrado se toma una alícuota de 25 ml en un vaso de precipitación.
- Añadir de 3 gotas de la solución de fenolftaleína, finalmente se valora con solución de NaOH 0.1 N hasta que adquiera coloración rosada que perdure durante 30 segundos.
- Los resultados se expresan en porcentaje de acidez en función del ácido láctico y se calculan empleando la siguiente expresión:

$$Acidez (\%) = \frac{a \times N \times meq}{b} \times 100$$

Dónde:

- a = Volumen en ml consumido de solución de NaOH 0.1 N.
N = Normalidad de la solución de NaOH.
meq = Masa molar expresada en g/mmol. Para el ácido láctico,
meq= 0.090 g/mmol
b = Masa en gramos de la muestra en la alícuota valorada,
determinado con la siguiente ecuación:

$$b = \frac{m \times V}{250}$$

Dónde:

- m = Masa inicial de la muestra (g)
V = Volumen de alícuota tomada (ml)

ANEXO F-3

DETERMINACIÓN DE Coliformes totales/*Escherichia coli* Expresado como número más probable (NMP/g)

MATERIALES

- Muestra de chorizo madurado
- Puntas de micropipeta de 1000 µl
- Botella de tapa azul de 250 ml
- Tubos de diluciones
- Micropipeta de 100 a 1000 µl
- Balanza analítica
- Cámara de rayos UV
- Tubos de ensayo bacteriológicos con tapa rosca

REACTIVOS

- Caldo Fluorocult™ LMX (Modified Lauryl Sulfate Broth with MUG)
- Agua de peptona
- Agua destilada

PROCEDIMIENTO

- Pesar 25 g de muestra en la balanza analítica.
- Colocar la muestra en una bolsa plástica con 225 ml de agua de peptona y homogenizar durante 10 min hasta desmenuzar completamente la muestra.
- Asépticamente se toma una alícuota de 1000 µl (1 ml) con una punta de micropipeta estéril y se transfiere a un tubo de dilución que contiene 9 ml de agua de peptona estéril. Se rotula como dilución 1/100.
- De la dilución 1/100 se toma asépticamente una alícuota de 1000 µl (1 ml) con otra punta de micropipeta estéril y se transfiere a otro tubo con 9 ml de agua de peptona estéril. Se rotula como dilución 1/1000.
- Se coloca asépticamente una alícuota de 1000 µl (1 ml) en un tubo de ensayo bacteriológico que contiene 15 ml de caldo Fluorocult™ LMX (Modified Sulfate Broth with MUG) de cada una de las diluciones anteriores. El ensayo se realiza por triplicado.
- Los tubos inoculados se incuban a 40°C durante 48 horas.
- Se evalúa como positivo el cambio de coloración del caldo de amarillo a azul.
- Los tubos positivos se examinan bajo una lámpara UV a 540 nm, en los cuales la presencia de fluorescencia es indicativo de la presencia de *Escherichia coli*.
- Los resultados se expresan como número más probable de Coliformes totales/*Escherichia coli* (NMP/g) en función al número de tubos positivos.

ANEXO F-4

DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE *Salmonella* sp. Determinación como ausencia/presencia

MATERIALES

- Tubos de ensayo bacteriológicos positivos a Coliformes totales/*Escherichia coli*
- Asa de transferencia
- Mechero de bunsen

REACTIVOS

- Medio de Agar MacConkey
- Agua destilada

PROCEDIMIENTO

- De uno de los tubos de la dilución 1/10 que hayan dado positivo a la prueba Coliformes totales/*Escherichia coli* se toma asépticamente una asada del caldo.
- En una caja que contenga Agar MacConkey gelificado se transfiere la asada tomada y se efectúa un rayado en la superficie del mismo.
- Se incuba a 40°C durante 48 horas.
- Se evalúa el desarrollo: si las colonias son translúcidas en el medio de cultivo, el resultado es presencia; caso contrario ausencia de *Salmonella* sp.

ANEXO F-5

DETERMINACIÓN DE *Staphylococcus aureus* Expresado como unidades formadoras de colonia (ufc/g)

MATERIALES

- Muestra de chorizo madurado
- Puntas de micropipeta de 1000 µl
- Botella de tapa azul de 250 ml
- Tubos de diluciones
- Micropipeta de 100 a 1000 µl
- Balanza analítica
- Cajas petri estériles

REACTIVOS

- Medio de cultivo Agar Manitol Sal Rojo Congo
- Agua de peptona
- Agua destilada

PROCEDIMIENTO

- Pesar 25 g de muestra en la balanza analítica.
- Colocar la muestra en una bolsa plástica con 225 ml de agua de peptona y homogenizar durante 10 min hasta desmenuzar completamente la muestra.
- Asépticamente se toma una alícuota de 1000 µl (1 ml) con una punta de micropipeta estéril y se transfiere a un tubo de dilución que contiene 9 ml de agua de peptona estéril. Se rotula como dilución 1/100.
- De la dilución 1/100 se toma asépticamente una alícuota de 1000 µl (1 ml) con otra punta de micropipeta estéril y se transfiere a otro tubo con 9 ml de agua de peptona estéril. Se rotula como dilución 1/1000.
- Se coloca asépticamente una alícuota de 1000 µl (1 ml) de la dilución correspondiente, en el centro de una caja petri estéril, sobre la cual se añade 20 ml de medio de cultivo Agar Manitol Sal Rojo Congo atemperado a 45 – 50 ° C. se aplican movimientos rotatorios con el fin de distribuir adecuadamente la muestra en el medio de cultivo. Se efectúa el ensayo por triplicado.
- Las cajas inoculadas se incuban a 37 °C durante 48 horas.
- Se realiza el recuento de las colonias desarrolladas en el medio de cultivo. El desarrollo de *Staphylococcus aureus* es en una forma exuberante, produciendo colonias con zonas amarillas. Mientras que los estafilococos no patógenos producen colonias pequeñas sin cambio de color.
- Se aplica una tinción de Gram para confirmar forma, agrupación y respuesta a la tinción del género *Staphylococcus*.

ANEXO F-6

DETERMINACIÓN DE *Clostridium perfringens* Expresado como unidades formadoras de colonia (ufc/g)

MATERIALES

- Muestra de chorizo madurado
- Puntas de micropipeta de 1000 µl
- Botella de tapa azul de 250 ml
- Tubos de diluciones
- Micropipeta de 100 a 1000 µl
- Balanza analítica
- Cajas petri estériles
- Jarra de anaerobiosis

REACTIVOS

- Medio de cultivo Agar Sulfito-polimixina-sulfadiazina
- Agua de peptona
- Agua destilada

PROCEDIMIENTO

- Pesar 25 g de muestra en la balanza analítica.
- Colocar la muestra en una bolsa plástica con 225 ml de agua de peptona y homogenizar durante 10 min hasta desmenuzar completamente la muestra.
- Asépticamente se toma una alícuota de 1000 µl (1 ml) con una punta de micropipeta estéril y se transfiere a un tubo de dilución que contiene 9 ml de agua de peptona estéril. Se rotula como dilución 1/100.
- De la dilución 1/100 se toma asépticamente una alícuota de 1000 µl (1 ml) con otra punta de micropipeta estéril y se transfiere a otro tubo con 9 ml de agua de peptona estéril. Se rotula como dilución 1/1000.
- Se coloca asépticamente una alícuota de 1000 µl (1 ml) de la dilución correspondiente, en el centro de una caja petri estéril, sobre la cual se añade 20 ml de medio de cultivo Agar Sulfito-polimixina-sulfadiazina atemperado a 45 – 50 ° C. se aplican movimientos rotatorios con el fin de distribuir adecuadamente la muestra en el medio de cultivo. Se efectúa el ensayo por triplicado.
- Las cajas inoculadas se incuban a 37 °C durante 48 horas en anaerobiosis.
- Se realiza el recuento de las colonias desarrolladas en el medio de cultivo. Las colonias de *Clostridium* son de color negro y redondas.

ANEXO F-7

DETERMINACIÓN DE *Lactobacillus curvatus* Expresado como unidades formadoras de colonia (ufc/g)

MATERIALES

- Muestra de chorizo madurado
- Puntas de micropipeta de 1000 µl
- Botella de tapa azul de 250 ml
- Tubos de diluciones
- Micropipeta de 100 a 1000 µl
- Balanza analítica
- Cajas petri estériles
- Jarra de anaerobiosis

REACTIVOS

- Medio de cultivo Agar Rogosa Man
- Agua de peptona
- Agua destilada

PROCEDIMIENTO

- Pesar 25 g de muestra en la balanza analítica.
- Colocar la muestra en una bolsa plástica con 225 ml de agua de peptona y homogenizar durante 10 min hasta desmenuzar completamente la muestra.
- Asépticamente se toma una alícuota de 1000 µl (1 ml) con una punta de micropipeta estéril y se transfiere a un tubo de dilución que contiene 9 ml de agua de peptona estéril. Se rotula como dilución 1/100.
- De la dilución 1/100 se toma asépticamente una alícuota de 1000 µl (1 ml) con otra punta de micropipeta estéril y se transfiere a otro tubo con 9 ml de agua de peptona estéril. Se rotula como dilución 1/1000.
- Se coloca asépticamente una alícuota de 1000 µl (1 ml) de la dilución correspondiente, en el centro de un caja petri estéril, sobre la cual se añade 20 ml de medio de cultivo Agar Rogosa Man atemperado a 45 – 50°C. se aplican movimientos rotatorios con el fin de distribuir adecuadamente la muestra en el medio de cultivo. Se efectúa el ensayo por triplicado.
- Las cajas inoculadas se incuban a 37 °C durante 48 horas en anaerobiosis (se colocan las cajas dentro de la jarra de anaerobiosis, en la cual se coloca una vela pequeña encendida con el fin de eliminar el oxígeno presente y se cierra herméticamente).
- Se realiza el recuento de las colonias desarrolladas en el medio de cultivo.
- Se aplica una tinción de Gram para confirmar forma y respuesta a la tinción del género *Lactobacillus*.

ANEXO F-8

DETERMINACIÓN DE *Staphylococcus carnosus* Expresado como unidades formadoras de colonia (ufc/g)

MATERIALES

- Muestra de chorizo madurado
- Puntas de micropipeta de 1000 µl
- Botella de tapa azul de 250 ml
- Tubos de diluciones
- Micropipeta de 100 a 1000 µl
- Balanza analítica
- Cajas petri estériles

REACTIVOS

- Medio de cultivo Agar Baird Parker
- Agua de peptona
- Agua destilada

PROCEDIMIENTO

- Pesar 25 g de muestra en la balanza analítica.
- Colocar la muestra en una bolsa plástica con 225 ml de agua de peptona y homogenizar durante 10 min hasta desmenuzar completamente la muestra.
- Asépticamente se toma una alícuota de 1000 µl (1 ml) con una punta de micropipeta estéril y se transfiere a un tubo de dilución que contiene 9 ml de agua de peptona estéril. Se rotula como dilución 1/100.
- De la dilución 1/100 se toma asépticamente una alícuota de 1000 µl (1 ml) con otra punta de micropipeta estéril y se transfiere a otro tubo con 9 ml de agua de peptona estéril. Se rotula como dilución 1/1000.
- Se coloca asépticamente una alícuota de 1000 µl (1 ml) de la dilución correspondiente, en el centro de una caja petri estéril, sobre la cual se añade 20 ml de medio de cultivo Agar Baird Parker atemperado a 45 – 50 ° C. se aplican movimientos rotatorios con el fin de distribuir adecuadamente la muestra en el medio de cultivo. Se efectúa el ensayo por triplicado.
- Las cajas inoculadas se incuban a 37 °C durante 48 horas.
- Se realiza el recuento de las colonias desarrolladas en el medio de cultivo. Las colonias de *Staphylococcus carnosus* son pequeñas de color amarillo; diferenciándose que si hubiesen colonias de *Staphylococcus aureus*, éstas serían más grandes y de color negro con la presencia de halos.
- Se aplica una tinción de Gram para confirmar forma, agrupación y respuesta a la tinción del género *Staphylococcus*.

ANEXOS G
ESTIMACIÓN ECONÓMICA

Tabla G-1. Materiales directos e indirectos

Materiales	Unidad	Cantidad	Precio Unitario (\$)	Precio Total (\$)
Carne de res	Kg	4,36	3,96	17,27
Carne de cerdo	Kg	1,82	2,42	4,40
Grasa	Kg	1,82	1,98	3,60
Hielo	Kg	0,40	0,30	0,12
Cultivo iniciador	g	2,50	0,80	2,00
Condimentos	lb	2,50	0,80	2,00
Químicos	Kg	0,15	5,00	0,73
Tripa natural de cerdo	m	10,00	0,24	2,40
TOTAL (\$)				32,52

Tabla G-2. Equipos y utensilios

Equipo	Costo (\$)	Vida Útil (años)	Costo Anual (\$)	Costo Día (\$)	Costo Hora (\$)	Horas de uso	Costo uso (\$)
Balanza 25 kg	100	10	10,0	0,04	0,00	0,50	0,00
Cuchillos inoxidables	24	5	4,8	0,02	0,00	0,66	0,00
Molino # 22	745	10	74,5	0,28	0,04	0,50	0,02
Embutidora 9 lt	1136	10	113,6	0,43	0,05	0,75	0,04
Piola de amarre	15	5	3,0	0,01	0,00	0,66	0,00
Tinas grandes	20	5	4,0	0,02	0,00	1,00	0,00
Utensilios	126	5	25,2	0,10	0,01	0,66	0,01
Congelador	1200	10	120,0	0,46	0,06	1,00	0,06
Horno ahumador (construcción)	4000	25	160,0	0,61	0,08	24,00	1,83
Cuarto de maduración (construcción)	5000	25	200,0	0,76	0,10	150,00	14,31
TOTAL(\$)							16,28

Tabla G-3. Suministros

Servicio	Unidad	Consumo	Valor Unitario (\$)	Valor Total (\$)
Agua	m ³	4	0,01	0,04
Luz	kW-h	15	0,13	1,95
Gas	kg	4	0,14	0,56
TOTAL (\$)				2,55

Tabla G-4. Personal

Hombres	Sueldo	Costo Día (\$)	Costo Hora (\$)	Horas utilizadas	Total (\$)
1	334,84	16,74	2,09	4	8,37
1	334,84	16,74	2,09	4	8,37
TOTAL(\$)					16,74

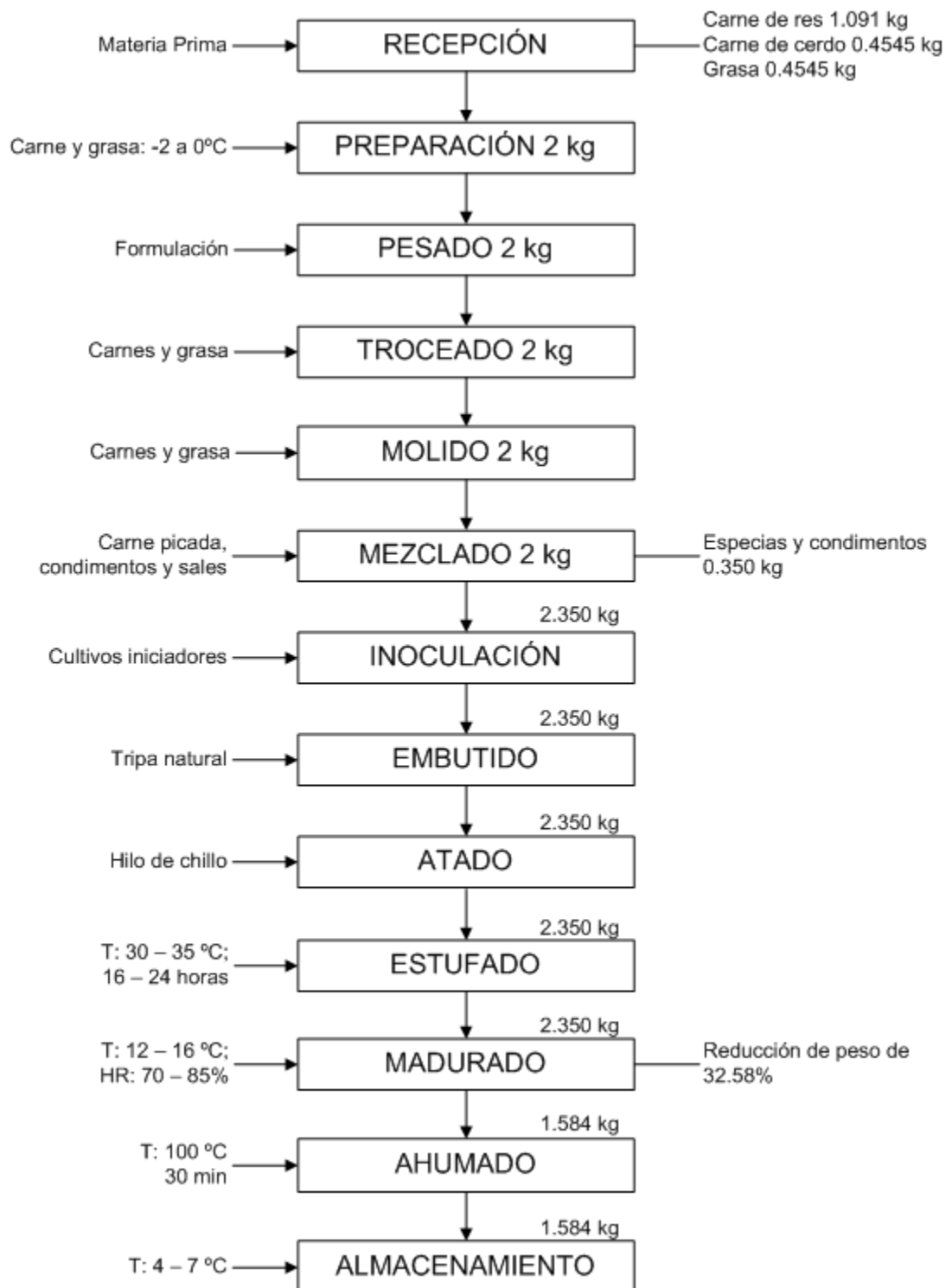
Tabla G-5. Inversión estimada para el procesamiento de chorizo (tipo Ambateño) madurado

Capital de Trabajo	Monto
1. Materiales Directos e Indirectos	\$ 32,52
2. Equipos y Utensilios	\$ 16,28
3. Suministros	\$ 2,55
4. Personal	\$ 16,74
TOTAL (\$)	\$ 68,09
CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN POR PARADA	6,61 Kg
Costo unitario (250 g)	\$ 2,58
Utilidad 20%	\$ 0,52
PRECIO DE VENTA	\$ 3,09

ANEXOS H

BALANCE DE MATERIALES

Diagrama H-1. Balance de materiales de elaboración de Chorizo (tipo Ambateño) madurado



Elaborado por: Lenin Daniel Sarabia, 2011

ANEXOS I

HOJAS Y FICHAS TÉCNICAS

Butcher & Packer Supply Company

P.O. BOX 71748 · MADISON HEIGHTS, MICH 48071

PHONE 248-583-1250

FAX 248-583-8085

WATS 800-521-3188

www.butcher-packer.com

Meat Starter Culture F-LC

F-LC is a freeze-dried culture well suited for all fermented sausages. The culture is recommended for the production of traditional fermented, dry sausages with a sourly flavor note.

F-LC is a mixed culture containing *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus* and *Staphylococcus xylosus* in a convenient freeze-dried form. *P. acidilactici* ensures reliable acidification whereas *S. xylosus* results in strong flavor development and a good, stable color. Due to bacteriocin production both *L. curvatus* and *P. acidilactici* contribute to suppressing growth of *Listeria monocytogenes*. The final pH may be adjusted with the amount of fermentable sugars added to the meat mix.

F-LC works well within a range of sugar levels from $\frac{1}{2}\%$ to 1%.

Each 25-gram packet of **F-LC** will do 220 pounds (100 kilo) of meat. You can use half of the packet in 100 pounds of meat, and refreeze remaining culture.

We feel it is difficult to make a batch smaller than 100 pounds due to the fact that the smallest accurate weight is 10 grams, and that is due to the distribution of the microorganisms. If you are making small batches, please use at least $\frac{1}{4}$ of the packet. Immediately prior to use, open pouch and disperse contents in amount of distilled water equal to 0.5% of the batch weight. After all other ingredients have been blended into the meat mix, add diluted culture with mixing. **GOOD DISTRIBUTION IS ESSENTIAL**. Do not allow the culture to directly contact the other ingredients prior to mixing with meat. Optimum growth @95°F internal meat temperature. This should be done in a smokehouse and controlled at this temperature until the culture has dropped the pH of the meat below 4.90pH. Fermentation usually takes a minimum of 30 hours depending on temperature and humidity.

The drying process is very critical. Under optimal conditions the drying room should be set at 60-70°F with a relative humidity of 68-72%.

To assure best quality, storage and shipment in tightly closed containers at 0°F to -20°F is recommended up to 6 months. It can be stored for short periods of time (during transit) at room temperature.

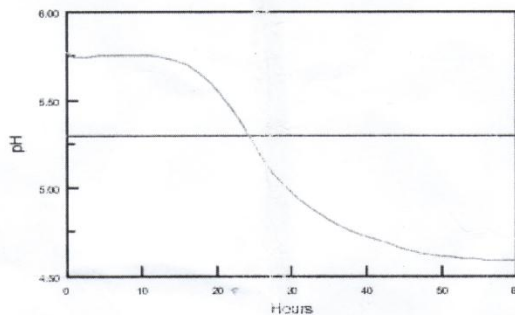


Figure 2. Acidification of Bacterferm™ F-LC in a standard Salami slurry at 24°C

The information and recommendations contained herein are to our knowledge presented in good faith and believed to be accurate. Because of the conditions of use many of which are beyond our control, we make no warranties or representations expressed or implied. The information is supplied upon the condition that the companies and persons receiving same will perform tests to determine the suitability for and purpose prior to use. In no event, however, will Butcher & Packer be responsible for damages of any nature resulting from the use or reliance of any information contained herein. Furthermore, nothing contained herein should be construed as permission or recommendations to infringe on any patent. No agent, representative or employee is authorized to vary any of the terms of this notice.

Butcher & Packer Supply Company

P.O. BOX 71748 · MADISON HEIGHTS, MICH. 48071

PHONE 248-583-1250

FAX 248-583-8085

WATS 800-521-3188

MEAT STARTER CULTURE

Bactoferm™ F-RM-52

Bactoferm™ F-RM-52 is a freeze-dried culture well suited for all fermented sausages where a relatively fast acidification is desired. The culture is recommended for the production of traditional North European types of fermented, dry sausages with a sourly flavor note.

Bactoferm™ F-RM-52 is a combination of carefully selected strains of *Lactobacillus curvatus* and *Staphylococcus carnosus*, which create a combination of fast acidification, and positive mild aroma developments as well as a stable color in the product. The final pH may be adjusted with the amount of fermentable sugars added to the meat mix.

Bactoferm™ F-RM-52 works well within a range of sugar levels from ½% to 1%.

Each 25-gram packet of **Bactoferm™ F-RM-52** will do 220 pounds (100 kilo) of meat. You can use the whole packet in 100 pounds of meat or use half of the packet and refreeze remaining culture. Use no less than 1/4 of packet when making less than 50 pounds of meat

Immediately prior to use, open pouch and disperse contents in amount of **distilled water** equal to ½% of the batch weight. After all other ingredients have been blended into the meat mix, add diluted culture with mixing. **GOOD DISTRIBUTION IS ESSENTIAL.** Do not allow the culture to directly contact the other ingredients prior to mixing with meat. Make sure culture is added within 45 minutes of rehydration or culture will die. Maximum growth @100°F, **Optimum growth @85°F**, Minimum growth @68°F internal meat temperature. This should be done in a smokehouse and controlled at this temperature until the culture has dropped the pH of the meat below published standards. In order to optimize the fermentation it is important to ferment at a minimum of 68°F for at least 48 hours (but could be as long as 4 days depending on the amount of pH drop needed). Fermentation and climatization procedures should be adapted to the customer's requirements. Taking of the pH is the responsibility of the customer and must be done to assure the amount of fermentation.

The drying process is very critical. Under optimal conditions the drying room should be set at 50F to 60°F with a relative humidity of 68-72%.

The information and recommendations contained herein are to our knowledge presented in good faith and believed to be accurate. Because of the conditions of use many of which are beyond our control, we make no warranties or representations expressed or implied. The information is supplied upon the condition that the companies and persons receiving same will perform tests to determine the suitability for and purpose prior to use. In no event, however, will Butcher & Packer be responsible for damages of any nature resulting from the use or reliance of any information contained herein. Furthermore, nothing contained herein should be construed as permission or recommendations to infringe on any patent. No agent, representative or employee is authorized to vary any of the terms of this notice.

Revised 2000

To assure best quality, storage and shipment in tightly closed containers at 0°F to -20°F is recommended up to 6 months. It can be stored for short periods of time (during transit) at room temperature.

Butcher & Packer Supply Company

P.O. BOX 71748 • MADISON HEIGHTS, MICH 48071

PHONE 248-583-1250

FAX 248-583-8085

WATS 800-521-3188

www.butcher-packer.com

Meat Starter Culture LHP

LHP is a freeze-dried culture well suited for all fermented sausages where a relatively pronounced acidification is desired. The culture is recommended for the production of traditional fermented, dry sausages with a sourly flavor note.

LHP Freeze dried meat starter culture is a broad range temperature *Pediococcus* blend. The concentrated meat microorganisms are a blend of two selected strains, *Pediococcus* sp, which create a combination of normal acidification, appositive aroma development, and a good, stable red color in the product. The final pH may be adjusted with the amount of fermentable sugars added to the meat mix.

LHP works well within a range of sugar levels from ½% to 1%.



Each 42-gram packet of **LHP** will do 500 pounds (225 kilo) of meat. You can use half of the packet in 100 pounds of meat, and refreeze remaining culture.

We feel it is difficult to make a batch smaller than 100 pounds due to the fact that the smallest accurate weight is 10 grams, and that is due to the distribution of the microorganisms. If you are making small batches, please use at least 10 grams which is about ¼ of the packet. Immediately prior to use, open pouch and disperse contents in amount of **distilled water** equal to 0.5% of the batch weight. After all other ingredients have been blended into the meat mix, add diluted culture with mixing. **GOOD DISTRIBUTION IS ESSENTIAL.** Do not allow the culture to directly contact the other ingredients prior to mixing with meat. Optimum growth @95°F internal meat temperature. This should be done in a smokehouse and controlled at this temperature until the culture has dropped the pH of the meat below 4.90pH. Fermentation usually takes a minimum of 8-12 hours depending on temperature and humidity.

The drying process is very critical. Under optimal conditions the drying room should be set at 60-70°F with a relative humidity of 68-72%.

To assure best quality, storage and shipment in tightly closed containers at 0°F to -20°F is recommended up to 6 months. It can be stored for short periods of time (during transit) at room temperature.

The information and recommendations contained herein are to our knowledge presented in good faith and believed to be accurate. Because of the conditions of use many of which are beyond our control, we make no warranties or representations expressed or implied. The information is supplied upon the condition that the companies and persons receiving same will perform tests to determine the suitability for and purpose prior to use. In no event, however, will Butcher & Packer be responsible for damages of any nature resulting from the use or reliance of any information contained herein. Furthermore, nothing contained herein should be construed as permission or recommendations to infringe on any patent. No agent, representative or employee is authorized to vary any of the terms of this notice.

 <p>LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN LAB-CESTTA</p>	<p>ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO</p> <p>CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL</p> <p>FACULTAD DE CIENCIAS Panamericana Sur Km. 1 ½ Teléfono: (03) 2 998232 RIOBAMBA - ECUADOR</p>	 <p>ENSAYOS No. OAE LE 2C 06-008</p>
---	--	--

INFORME DE ENSAYO No: 0961
ST: 11 – 0052 ANÁLISIS DE ALIMENTOS

Nombre Peticionario: Srta. Karina Tapia
Atn: -
Dirección: Cdla Las Retamas, Riobamba, Ecuador

FECHA: 06 de Marzo de 2011
NUMERO DE MUESTRAS: 1
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB: 2011 / 04 / 28 – 18:20
FECHA DE MUESTREO: 2011 / 04 / 27 – 10:00
FECHA DE ANÁLISIS: 2011 / 04 / 28 - 2011 / 05 / 06
TIPO DE MUESTRA: Chorizo
CÓDIGO LAB-CESTTA: LAB-Alm 159-11
CÓDIGO DE LA EMPRESA: N.A
PUNTO DE MUESTREO: UTA Laboratorio Ciencias - Ingeniería en Alimentos
ANÁLISIS SOLICITADO: Análisis Proximal
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA: Sr. Lenín Sarabia
CONDICIONES AMBIENTALES: T máx.:25.0 °C. T min.: 21.0°C

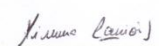
RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETRO	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LIMITE PERMISIBLE
*Proteína	PEE /LAB-CESTTA/104 AOAC/ Volumétrico	%	14,10	--
*Grasa	PEE /LAB-CESTTA/102 AOAC/ Gravimétrico	%	27,47	--
*Humedad	PEE/LAB-CESTTA/80 AOAC/ Gravimétrico	%	35,98	--
*Cenizas	PEE /LAB-CESTTA/101 AOAC/ Gravimétrico	%	5,95	--

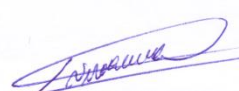
OBSERVACIONES:

- Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de acreditación del OAE
- Parámetros expresados en base fresca
- Muestra receptada en laboratorio

RESPONSABLES DEL INFORME:


BQF. Ximena Carrión
RESPONSABLE TÉCNICO

LABORATORIO DE ANALISIS AMBIENTAL
E INSPECCION
LAB - CESTTA
ESPPOCH


Dra. Nancy Veloz M
JEFE DE LABORATORIO