



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

DIRECCIÓN DE POSGRADO

MAESTRÍA EN AGROINDUSTRIA CON MENCIÓN EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

MODALIDAD: PROYECTO DE DESARROLLO

Título:

**"PODER BIOCONSERVADOR DEL AHUMADO, LA NISINA Y EL
ACEITE ESENCIAL DE CLAVO DE OLOR (*Syzygium aromaticum*), EN
SALCHICHAS FRANKFURT"**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de magister en
Agroindustrias mención en Tecnología de Alimentos

Autor:

Guanochanga Montatixe John Michael Ing.

Tutor:

Fernández Paredes Manuel Enrique Ing. M.Sc.

**LATACUNGA –ECUADOR
2023**

APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de Tutor del Trabajo de Titulación "**PODER BIOCONSERVADOR DEL AHUMADO, LA NISINA Y EL ACEITE ESENCIAL DE CLAVO DE OLOR (*Syzygium aromaticum*), EN SALCHICHAS FRANKFURT**" presentado por Guanochanga Montatixe John Michael, para optar por el título magíster en Agroindustrias mención en Tecnología de Alimentos.

CERTIFICO

Que dicho trabajo de investigación ha sido revisado en todas sus partes y se considera que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación para la valoración por parte del Tribunal de Lectores que se designe y su exposición y defensa pública.

Latacunga, febrero, 2023



Ing. M.Sc. Manuel Enrique Fernández Paredes
CC.:0501511604

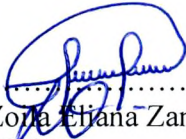
APROBACIÓN TRIBUNAL

El trabajo de Titulación: "**PODER BIOCONSERVADOR DEL AHUMADO, LA NISINA Y EL ACEITE ESENCIAL DE CLAVO DE OLOR (*Syzygium aromaticum*), EN SALCHICHAS FRANKFURT**", ha sido revisado, aprobado y autorizada su impresión y empastado, previo a la obtención del título de Magíster en Agroindustrias mención en Tecnología de Alimentos; el presente trabajo reúne los requisitos de fondo y forma para que el estudiante pueda presentarse a la exposición y defensa.

Latacunga, febrero, 2023



.....
Ing. María Monserrath Morales, Mg.
1803691144
Presidente del tribunal



.....
Ing. Zonia Eliana Zambrano, Mg.
0501773931
Lector 2



.....
Ing. Renato Agustín Romero, Mg
1717122483
Lector 3

DEDICATORIA

A Dios, quien me guía siempre por el buen camino, por haberme dado salud y valor para lograr culminar mi maestría.

A mis padres Wilson Guanochanga y Silvia Montatixe, que gracias a sus enseñanzas, valores, perseverancia y sacrificio me han motivado día a día a alcanzar mis objetivos y metas que se ven reflejados en este anhelado logro académico, a mi hermana Angie por siempre estar a mi lado brindándome su apoyo, a ustedes gracias por enseñarme a afrontar las dificultades sin perder nunca la cabeza ni morir en el intento.

John Michael

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento primero a Dios por haberme permitido culminar una etapa más en mi vida profesional, agradecer a mis padres por haberme enseñado que los sueños son para cumplirlos.

Agradezco a la Universidad Técnica de Cotopaxi en especial a la directora de posgrado Mg. Giovana Parra, así también a la coordinadora de la maestría en Agroindustria con mención tecnología de los alimentos la Mg. Monserrath Morales quienes han estado junto a mí, brindándome su apoyo incondicional durante este trayecto, al Mg. Manuel Fernández cuyo aporte, dedicación y tiempo fue fundamental para el desarrollo de este proyecto de investigación.

John Michael Guanochanga Montatixe

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Quien suscribe, declara que asume la autoría de los contenidos y los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación.

Latacunga, febrero, 2023



John Michael Guanochanga Montatixe
1724397953

RENUNCIA DE DERECHOS

Quien suscribe, cede los derechos de autoría intelectual total y/o parcial del presente trabajo de titulación a la Universidad Técnica de Cotopaxi.

Latacunga, febrero, 2023

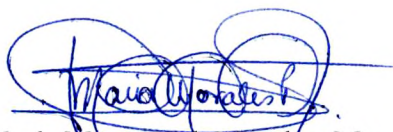
A handwritten signature in blue ink, appearing to read "John Michael Guanochanga Montatixe", is written over a horizontal blue line.

John Michael Guanochanga Montatixe
1724397953

AVAL DEL PRESIDENTE

Quien suscribe, declara que el presente Trabajo de Titulación: **"PODER BIOCONSERVADOR DEL AHUMADO, LA NISINA Y EL ACEITE ESENCIAL DE CLAVO DE OLOR (*Syzygium aromaticum*), EN SALCHICHAS FRANKFURT"** contiene las correcciones a las observaciones realizadas por los miembros del tribunal en la predefensa.

Latacunga, febrero, 2023



Ing. María Monserrath Morales, Mg.
1803691144

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
DIRECCIÓN DE POSGRADO

**MAESTRÍA EN AGROINDUSTRIAS CON MENCIÓN EN TECNOLOGÍA
DE ALIMENTOS**

Título: "PODER BIOCONSERVADOR DEL AHUMADO, LA NISINA Y EL ACEITE ESENCIAL DE CLAVO DE OLOR (*Syzygium aromaticum*), EN SALCHICHAS FRANKFURT"

Autor: Guanochanga Montatixe John Michael Ing.

Tutor: Fernández Paredes Manuel Enrique M.Sc.

RESUMEN

En la actualidad, la población está interesada en consumir alimentos libres de nitritos y nitratos cuya ingesta prolongada y en concentraciones altas son potencialmente dañinas para la salud del ser humano, los métodos de bioconservación proponen una alternativa que reduzca el uso de estos conservantes químicos en productos cárnicos. El objetivo principal de este estudio fue evaluar la capacidad bioconservante del ahumado, nisina y del aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) sobre la salchicha Frankfurt, para ello se elaboró una salchicha Frankfurt donde se incluyó en su formulación 2mg/Kg de nisina, 0.5 mg/Kg de aceite esencial de clavo de olor y el ahumado natural con madera de cedro, con el fin de determinar su capacidad bioconservante se realizó siembras microbiológicas según la Norma Técnica INEN 1338:2016 durante 0, 10 y 20 días para Aerobios Mesófilos, *E. coli*, y *Staphylococcus aureus*, así también se realizó un análisis sensorial donde se usó la metodología de la escala hedónica evaluando el color, olor, sabor y aceptación con un panel de catadores semientrenados para conocer cuál de los tratamientos usados fue el que tuvo mayor aceptación organoléptica. Se determinó la composición proximal de la salchicha Frankfurt obteniendo como resultado 60.77% de humedad, 13.53% de proteína, 13.31% de grasa 3.09% de cenizas y 809.38 mg/100 gr de sal. Los resultados de los análisis microbiológicos muestran que la salchicha Frankfurt + nisina fue el mejor tratamiento ya que demostró tener el mayor poder bioconservador durante los 20 días de evaluación. La salchicha Frankfurt + clavo de olor fue el tratamiento que más gusto al panel de catadores obteniendo en promedio 6.7 puntos de aceptación organoléptica.

PALABRAS CLAVE: aceite esencial, aerobios mesófilos, ahumado, bioconservación, *E. coli*, nisina, salchicha Frankfurt, *Staphylococcus Aureus*.

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
DIRECCIÓN DE POSGRADO

**MAESTRÍA EN AGROINDUSTRIAS CON MENCIÓN EN TECNOLOGÍA
DE ALIMENTOS**

Title: "BIOCONSERVATIVE POWER OF SMOKING, NISIN AND ESSENTIAL OIL OF CLOVE SMELL (*Syzygium aromaticum*), IN FRANKFURT SAUSAGES".

Author: Guanochanga Montatixe John Michael Ing.

Tutor: Fernández Paredes Manuel Enrique M.Sc.

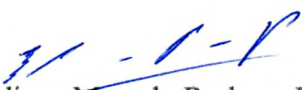
ABSTRACT

Currently, the population is interested to consume foods free of nitrites and nitrates with ones prolonged ingestion and high concentrations are potentially harmful to human health, and biopreservation methods propose an alternative that reduces the use of these chemical preservatives in meat products. The main objective of this study was to evaluate biopreserving smoking capacity, nisin and clove essential oil (*Syzygium aromaticum*) on Frankfurter sausage, for this purpose a Frankfurter sausage was prepared with 2 mg/kg of nisin, 0.5 mg/Kg of clove essential oil and natural smoking with cedar wood, in order to determine its biopreserving capacity, microbiological sowings were performed according to the Standard INEN Technical 1338:2016 for 0, 10 and 20 days for *Mesophilic Aerobes*, *E. coli*, and *Staphylococcus aureus*. A sensory analysis was also performed using hedonic methodology scale, evaluating color, odor, flavor and acceptance with a panel of semi-trained tasters to determine which of the used treatments had the highest organoleptic acceptance. The proximate composition the Frankfurter sausage was determined, resulting in 60.77% moisture, 13.53% protein, 13.31% fat, 3.09% ash and 809.38 mg/100 g salt. The results of the microbiological analyses show that Frankfurt sausage + nisin was the best treatment since it demonstrated the highest biopreserving power during 20 days of evaluation. The Frankfurt sausage + clove was the treatment that the panel of tasters liked the most, obtaining an average of 6.7 organoleptic acceptance points.

KEY WORDS: essential oil, *Mesophilic aerobes*, smoking, biopreservation, *E. coli*, nisin, Frankfurter sausage, *Staphylococcus Aureus*.

Edison Marcelo Pacheco Pruna con cédula de identidad número: 0502617350 Licenciado en Ciencias de la educación mención Inglés con número de registro de la SENESCYT: 1020-12-1169234; **CERTIFICO** haber revisado y aprobado la traducción al idioma inglés del resumen del trabajo de investigación con el título: "**PODER BIOCONSERVADOR DEL AHUMADO, LA NISINA Y EL ACEITE ESENCIAL DE CLAVO DE OLOR (*Syzygium aromaticum*), EN SALCHICHAS FRANKFURT**" de: John Michael Guanochanga Montatixe ,aspirante a magister en Agroindustria con mención en tecnología de alimentos.

Latacunga, febrero, 2023


Edison Marcelo Pacheco Pruna
0502617350

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
APROBACIÓN TRIBUNAL	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA	vi
RENUNCIA DE DERECHOS.....	vii
AVAL DEL PRESIDENTE.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
ÍNDICE DE CONTENIDOS	xii
ÍNDICE DE TABLAS	xvii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xviii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xix
INFORMACIÓN GENERAL.....	1
Título del Proyecto:.....	1
Línea de investigación:	1
Sublínea de investigación:	1
INTRODUCCIÓN	2
Justificación.....	6

Planteamiento del problema.....	9
Hipótesis.....	11
Hipótesis Nula.....	11
Hipótesis Alternativa.....	11
Objetivo General	11
Objetivos Específicos.....	11
1. CAPÍTULO I. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	13
1.1. Antecedentes	13
1.2. Salchicha Frankfurt	16
1.2.1. Características de salchicha Frankfurt tradicional	16
1.2.2. Conservación de salchichas	17
1.2.3. Aditivos alimentarios:.....	19
1.2.3.1. Clasificación de los aditivos alimentarios:.....	19
1.2.4. Conservación de alimentos	19
1.2.5. Aditivos para la conservación de alimentos	20
1.3. Nisina	21
1.3.1. Bacteriocina	21
1.3.1.1. Definición y características de las bacteriocinas.....	21
1.3.1.2. Bacteriocinas derivadas de bacterias ácido lácticas	22
1.4. Clavo de olor (<i>Syzygium aromaticum</i>):	23

1.4.1.	Origen	23
1.4.2.	Descripción taxonómica	24
1.4.3.	Descripción botánica.....	24
1.4.4.	Composición química	25
1.4.5.	Mecanismo de acción del clavo de olor.....	26
1.5.	Ahumado	27
1.5.1.	Historia del ahumado	27
1.5.2.	Definición del ahumado.....	27
1.5.3.	Ventajas del ahumado:.....	28
1.5.4.	Desventajas del ahumado:	28
1.5.5.	Tipos de ahumado	28
1.5.5.1.	Ahumado frío:	28
1.5.5.2.	Ahumado caliente.....	29
1.5.5.3.	Ahumado por fricción	29
2.	CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
2.1.	Modalidad o enfoque de la investigación.....	30
2.2.	Tipo de investigación	30
2.2.1.	Investigación experimental	30
2.2.2.	Investigación exploratoria.....	31
2.2.3.	Investigación bibliográfica	31

2.3.	Métodos de investigación.....	31
2.3.1.	Inductivo	31
2.3.2.	Deductivo.....	32
2.4.	Técnicas de investigación	32
2.4.1.	Observación	32
2.4.2.	Recopilación de datos estadísticos.....	32
2.5.	Instrumentos de investigación.....	33
2.5.1.	Formulación de la salchicha Frankfurt	33
	Para la formulación de la salchicha Frankfurt se utilizó como referencia la matriz de formulaciones de embutidos de pasta fina del departamento de desarrollo e investigación de la empresa Embutser, como se muestra en la <i>tabla 1</i>	33
2.5.2.	Proceso de elaboración de la salchicha Frankfurt	34
2.5.2.1.	Recepción de las materias primas cárnicas	34
2.5.2.2.	Troceado y molido	34
2.5.2.3.	Cuteado	35
2.5.2.4.	Embutido.....	35
2.5.2.5.	Escaldado y enfriado	35
2.5.2.6.	Diagrama de flujo del proceso de elaboración de Salchicha Frankfurt	37
2.6.	Análisis proximal	38
2.6.1.	Determinación del contenido de humedad.....	38

2.6.2.	Determinación del contenido de proteína	38
2.6.3.	Determinación del contenido de grasa.....	38
2.6.4.	Determinación del contenido de sal.....	39
2.6.5.	Determinación del contenido de cenizas	39
2.7.	Análisis microbiológico	39
2.7.1.	Metodología para el análisis de Aerobios mesófilos	39
2.7.1.1.	Interpretación de resultados:	40
2.7.2.	Metodología para el análisis de <i>Escherichia. Coli</i>	41
2.7.2.1.	Interpretación de resultados:	41
2.7.3.1.	Interpretación de resultados:	42
2.8.	Análisis sensorial	43
2.9.	Diseño experimental.....	44
2.9.1.	Cuadro de variables:	45
2.10.	Modelo matemático:.....	46
2.11.	Esquema de campo:.....	47
2.12.	Análisis estadístico:.....	47
3.	CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
3.1.	Análisis proximal de la formulación de Salchicha Frankfurt	48
3.1.1.	Interpretación y discusión de la tabla 6	48
3.2.	Resultados de los análisis microbiológicos:.....	50

3.2.1.	Análisis microbiológicos para Aerobios mesófilos.	51
3.2.2.	Interpretación y discusión de las tablas 6 y 7	51
3.2.3.	Interpretación y discusión de las tablas 9 y 10	53
3.2.4.	Interpretación y discusión de las tablas 11 y 12	55
3.2.5.	Interacción de los tratamientos	56
3.2.6.	Interpretación y discusión de las tablas 13	58
3.3.	Análisis sensorial	59
3.3.1.	Análisis e interpretación de la figura 7	60
3.3.2.	Análisis e interpretación de la figura 8	61
3.3.3.	Análisis e interpretación de la figura 9	62
3.3.4.	Análisis e interpretación de la figura 10	63
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		64
CONCLUSIONES		64
RECOMENDACIONES		65
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		66
ANEXOS		76

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Formulación de la salchicha Frankfurt.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabla 2. Valores de la escala hedónica</i>	<i>44</i>
<i>Tabla 3. Cuadro de variables</i>	<i>44</i>

<i>Tabla 4. Modelo matemático ANOVA A x B.....</i>	<i>46</i>
<i>Tabla 5. Esquema de campo</i>	<i>47</i>
<i>Tabla 6. Composición proximal de la salchicha Frankfurt.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabla 7. Anova del análisis microbiológico de los Aerobios Mesófilos 0 días</i>	<i>51</i>
<i>Tabla 8. Prueba de Tukey del análisis microbiológico de los Aerobios Mesófilos 0 días.....</i>	<i>51</i>
<i>Tabla 9. Anova del análisis microbiológico de los Aerobios Mesófilos 10 días. ...</i>	<i>52</i>
<i>Tabla 10. Prueba de Tukey del análisis microbiológico de los Aerobios Mesófilos 10 días.....</i>	<i>52</i>
<i>Tabla 11. Anova del análisis microbiológico de los Aerobios Mesófilos 20 días. ...</i>	<i>54</i>
<i>Tabla 12. Prueba de Tukey del análisis microbiológico de los Aerobios Mesófilos 20 días.....</i>	<i>55</i>
<i>Tabla 13. Resultados de análisis microbiológico de E. coli y Sthapylococcus Aureus</i>	<i>57</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Clavo de olor.....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de Salchicha Frankfurt.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 3. Recuento de colonias de Aerobios mesófilos</i>	<i>40</i>

<i>Figura 4. Interpretación de resultados del recuento de E. coli</i>	41
<i>Figura 5. Recuento de colonias de S. Aureus</i>	43
<i>Figura 6. Resultados característica olor</i>	60
<i>Figura 7. Resultados característica sabor</i>	61
<i>Figura 8. Resultados característica color</i>	62
<i>Figura 9. Resultados de aceptabilidad</i>	63

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Proceso de elaboración de la salchicha Frankfurt	76
Anexo 2. Resultados fisicoquímicos salchicha Frankfurt testigo	78
Anexo 3. Resultados microbiológicos salchicha Frankfurt testigo	79
Anexo 4. Requisitos microbiológicos para productos cárnicos cocidos.Fuente: (INEN 1338, 2016).....	80
Anexo 5. Resultados siembras microbiológicas réplica 1	88
Anexo 6 Resultados siembras microbiológicas réplica 2.....	89
Anexo 7. Resultados análisis sensorial réplica 1	90
Anexo 8. Resultados análisis sensorial réplica 2	91
Anexo 9. Modelo prueba de catación.....	92

INFORMACIÓN GENERAL

Título del Proyecto: "PODER BIOCONSERVADOR DEL AHUMADO, LA NISINA Y EL ACEITE ESENCIAL DE CLAVO DE OLOR (*Syzygium aromaticum*), EN SALCHICHAS FRANKFURT"

Línea de investigación: DESARROLLO Y SEGURIDAD ALIMENTARIA. PROCESOS INDUSTRIALES.

Se define la línea de investigación como “Desarrollo y seguridad alimentaria” puesto que en la presente investigación se evalúa diferentes bioconservantes nisina, aceite esencial de clavo de olor y ahumado como alternativa para reducir el uso de nitratos y nitritos en salchichas Frankfurt y como “Procesos industriales” debido a que se formula y se elabora una salchicha Frankfurt donde se sometió a evaluación por un panel de catadores semientrenados para determinar el mejor tratamiento a nivel sensorial con la posibilidad de ser producido a nivel industrial.

Sublínea de investigación: ANÁLISIS CUALITATIVO, CUANTITATIVO Y SENSORIAL DE ALIMENTOS Y NO ALIMENTOS DE PRODUCTOS AGROINDUSTRIALES (métodos, normas, bpm, inocuidad de alimentos, seguridad alimentaria, etc.).

Se define como Sublínea de investigación “Análisis cualitativo, cuantitativo y sensorial de alimentos y no alimentos de productos Agroindustriales” ya que se realiza análisis microbiológicos con el fin de determinar la calidad e inocuidad del

proceso de elaboración de la salchicha Frankfurt compuesto por los distintos bioconservadores evaluados.

INTRODUCCIÓN

“Los aditivos alimentarios son sustancias que se añaden a los alimentos para mantener o mejorar su inocuidad, frescura, sabor, textura y aspecto. La FAO (Organización de las Naciones Unidas) y la OMS (Organización Mundial de la salud), son los entes rectores encargados de determinar la inocuidad de los aditivos alimentarios naturales y sintéticos, los mismos son autorizados cuando existe evidencia científica que dichos compuestos no alteran a la salud de las personas que las consuman estableciendo dosis específicas y su uso en alimentos concretos. Sin embargo, existen diferentes problemas a la salud que son atribuidos a la ingesta de aditivos de origen químico sintético presentes en alimentos consumidos en la dieta diaria de la población tales como: alergias, obesidad, diabetes, cáncer y enfermedades inflamatorias del intestino” (Lima et al., 2016).

“Los nitratos y nitritos son compuestos químicos inorgánicos derivados del nitrógeno, que se encuentran naturalmente en alimentos vegetales y de manera adicionada en algunos productos cárnicos procesados. La ingesta y exposición a iones de nitrato (NO_3^-) y nitrito (NO_2^-) en la dieta ha sido amplia e históricamente controversial ya que es bien reconocido que los nitritos adicionados en procesados cárnicos pueden transformarse en N-nitrosaminas altamente carcinogénicas, pues se estima que para la elaboración carnes procesadas como salchichas, salamis, jamones y tocinos en promedio se adiciona 6,1 mg/100 gr de nitratos y 18,2 mg/100

g de nitritos, por lo que se ha sugerido precaución en su consumo” (Londoño y Gómez, 2020).

“El cáncer es el riesgo de salud más importante que se ha asociado históricamente con el nitrato y el nitrito, aunque estos compuestos no son carcinógenos en sí mismos, tienen el potencial de reaccionar con otros compuestos dentro de los alimentos durante la cocción o en el tracto digestivo para formar compuestos N-nitrosos como las nitrosaminas” (Bedale et al., 2016).

La exposición tanto crónica como continua a dosis bajas de nitrosaminas presentan alta importancia a nivel toxicológico para las personas, debido a que son factores de riesgo que conllevan a la aparición de cáncer en órganos y tejidos, tales como: pulmones, cerebro, hígado, riñón, vejiga, estómago e incluso el esófago. Se estima que alrededor del 80% de estos compuestos químicos que han sido analizadas generan cáncer en mamíferos, donde la dimetilnitrosamina, un miembro de la familia de las nitrosaminas presente en los alimentos, es altamente carcinogénica para el hígado y los riñones en casi todas las especies analizadas (Amorosino et al., 2020).

“Las nitrosaminas requieren bioactivación para ser carcinogénicas, se sabe que la activación procede primero por la hidroxilación de un carbono y se forma una nitrosamina primaria inestable, que finalmente se tautomeriza a un ion carbonio, este ion altamente reactivo se alquila fácilmente con macromoléculas celulares cercanas. El cáncer y la mutagenicidad se desarrollan cuando los metabolitos reactivos de la nitrosamina reaccionan con macromoléculas genéticas” (Bedale et al., 2016).

De acuerdo con Bedale (2016), los nitratos y nitritos inicialmente no son compuestos carcinógenos en su forma natural, necesitan un proceso de bioactivación es decir reaccionar con moléculas inestables que por distintos procesos químicos como alquilación y tautomerización forman nitrosaminas compuestos que si pueden dar origen a la formación de cáncer.

Aun teniendo en cuenta los efectos negativos que ocasionan los conservantes químicos a largo plazo se siguen empleando en los alimentos, la industria alimentaria se ha basado en el desarrollo de sustancias químicas-sintéticas, las cuales pueden ser adicionadas a las fórmulas preservantes para inhibir el desarrollo de bacterias patógenas, mas no para prolongar la vida útil del alimento (Silva et al., 2016).

Martínez (2021), menciona que actualmente existe una tendencia importante por parte de los consumidores en demandar alimentos naturales o que sean mínimamente procesados y sin conservadores sintéticos, los consumidores consideran que muchos alimentos procesados presentan una calidad nutricional pobre y que los aditivos sintéticos son peligrosos para la salud. Como resultado de estas demandas, se tiene un gran interés en desarrollar alimentos con agentes antimicrobianos naturales, los cuales deben ser inocuos, que cumplan con los parámetros de calidad y seguridad de las normativas aplicables para agentes antimicrobianos y que además presenten alto espectro de efectividad contra microorganismos.

Una de las alternativas para la obtención de alimentos denominados sanos (libres de químicos, microorganismos y con larga vida de anaquel), es el estudio y

desarrollo de bioconservantes. Estos son definidos como el uso de microorganismos, enzimas o antimicrobianos naturales para preservar a los alimentos contra el deterioro causado por microorganismos patógenos o el crecimiento general del microbiota, sin que provoque en el alimento grandes cambios en sus propiedades tecno-funcionales, fisio-funcionales, y/o las propiedades sensoriales. Las bacteriocinas son una opción atractiva como parte de la solución a estos problemas, estos son péptidos con actividad antimicrobiana, segregadas por un gran número de bacterias para inhibir el crecimiento de otros microorganismos competidores, las bacteriocinas más estudiadas son producidas por bacterias ácido lácticas (BAL) (Bhojraj et al., 2021).

Estas bacterias son reconocidas como GRAS (por sus siglas en inglés: *general regarding as safe*), las cuales participan en la fermentación y conservación de alimentos, mejorando su calidad higiénica al inhibir la flora competitiva la cual incluye microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* y *Salmonella* (Soundharrajan et al., 2021).

Así también se han realizado estudios de aceites esenciales como conservantes naturales de los alimentos. Pino y Aragüez (2021), afirman que “los aceites esenciales son productos caracterizados por un fuerte olor, constituidos por mezclas complejas de compuestos volátiles y obtenidos a partir de algún material natural mediante destilación seca, con agua o vapor”, los mismos que son extraídos de cualquier parte de la planta: hojas, flores, frutos, tallos o raíces y que estén libres de cualquier enfermedad o contaminación. Varias investigaciones han demostrado

la eficacia de los aceites esenciales sobre determinados microorganismos que tienden al deterioro de los alimentos, tal es el caso de Matiacevich y Sáez (2017) donde analizó los aspectos más importantes para el desarrollo de preservantes a base de aceite esencial de *Cymbopogon* encapsulado; el cual demostró actividad antimicrobiana ante varios microorganismos permitiendo preservar el alimento de una forma natural.

El ahumado es un proceso en el que los alimentos se deshidratan gracias al humo y al aire seco, otorgándoles un sabor especial creado por la madera previamente seleccionada para darle un carácter organoléptico con el fin de prevenir ataques bacterianos que actúan como conservantes y protegen los alimentos (Altamirano et al., 2021).

Por tal motivo, en el presente estudio se enfocará en determinar el poder bioconservador de la nisina, el aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), y ahumado en el desarrollo de una salchicha Frankfurt, con el fin de poner a consideración distintas alternativas de conservación no sintéticos que eviten el crecimiento de microorganismos que afectan la calidad de los alimentos, este estudio permitirá generar una alternativa para prolongar la vida útil de los productos y que no afecten a la salud de los consumidores.

Justificación

En la actualidad, la población está interesada en consumir alimentos libres de patógenos, con la menor cantidad de aditivos químicos, que sean sensorialmente

aceptables, con un elevado valor nutricional y que represente una alternativa en la prevención de enfermedades.

Las sales nitrificantes, nitratos y nitritos, son conservantes inorgánicos que se emplean con regularidad como aditivos alimentarios, sobre todo en productos cárnicos, por su efecto antimicrobiano, sin embargo, el uso de los nitratos es discutido ya que puede dar lugar, en determinadas condiciones, a la formación de nitrosaminas, potencialmente cancerígenas. Esta situación ha obligado a una estricta regulación y al desarrollo de posibles sustitutos más naturales con las mismas propiedades antimicrobianas y de conservación.

A nivel mundial la nisina es ampliamente utilizada como método de conservación en alimentos como embutidos, jugos, conservas. Moreno (2022), usa la nisina para inhibir bacterias patógenas en el queso, con la adición de 200 mg/kg, al reducir la carga bacteriana de *Staphylococcus aureus*; mejorar las características fisicoquímicas, con el uso de 0,4% de nisina, con mayor contenido de proteína (17,77%) y sólidos totales (4,22%); en las propiedades sensoriales no existe diferencias significativas entre las muestras; y el tiempo de vida útil se extiende hasta los 12 días.

Castro en 2021, realiza el análisis microbiológico a un chorizo parrillero haciendo uso de aceite esencial de clavo de olor donde se permitió evidenciar la buena calidad y la idoneidad sanitaria de la misma ya que, hubo ausencia de *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes*; del mismo modo las esporas de *Clostridium sulfito reductor*, *Staphylococcus aureus* resultaron negativos; Para *Escherichia coli* hubo un recuento de 1 UFC/g en la dilución 10^1 , teniendo en

cuenta que la siembra se realizó por superficie y aplicando las normas de recuento esto da como resultado 100UFC/g, siendo este un bajo recuento.

Zambrano (2021), evalúa las características sensoriales de un embutido (longaniza ahumada) a partir de diferentes formulaciones, los resultados demostraron que el tratamiento mayor tuvo igual característica organoléptica que el testigo en el atributo textura p-valor < 0,05 mientras que los demás atributos no tuvieron significancia estadística p-valor < 0,05. Se establece que la formulación tratamiento mayor es de igual característica sensorial con la longaniza artesanal en cuanto a la textura, la misma que puede ser empleada para dimensionar su proceso de elaboración a otra escala.

De esta manera, por medio de la presente investigación se evaluó la capacidad conservante del ahumado, nisina, el aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y ahumado sobre la salchicha Frankfurt, con el fin de identificar cada una de las concentraciones óptimas para la obtención de un producto saludable, nutritivo y sin la presencia de sustancias cancerígenas.

Finalmente, los beneficiarios directos de la presente investigación son los consumidores de embutidos, quienes identificarán una alternativa saludable para su consumo, con altos índices de calidad y sabor. De igual manera, conocerán cada uno de los efectos perjudiciales con los que cuentan ciertos embutidos que en la actualidad se encuentran dentro del mercado. Los beneficiarios indirectos son los investigadores y personas que analicen los embutidos, quienes identificarán la factibilidad de la creación de un nuevo producto con el uso de bioconservantes.

Planteamiento del problema

“La causa fundamental de alteración de los alimentos, y el factor que limita la vida útil de muchos de ellos, son los microorganismos (bacterias, levaduras y mohos). El problema del deterioro microbiano de los alimentos tiene implicaciones económicas evidentes, tanto para los fabricantes (deterioro de materias primas y productos elaborados antes de su comercialización, pérdida de la imagen de marca, etc.) como para distribuidores y consumidores (deterioro de productos después de su adquisición y antes de su consumo). Se calcula que más del 20% de todos los alimentos producidos en el mundo se pierden por acción de los microorganismos” (Londoño y Gómez, 2020).

Para evitar el deterioro de los alimentos por causa de los microorganismos, la industria alimentaria emplea el uso de conservantes de origen químico, muchos de ellos son perjudiciales para la salud del ser humano, tal es el caso de los nitratos y nitritos cuya exposición prolongada puede originar distintos tipos de cáncer, por otra parte sin la acción antimicrobiana de estos conservantes, los productos pueden presentar alteraciones en su calidad es decir en sus características organolépticas, así como también; en su inocuidad, por ejemplo “la toxina botulínica, producida por la bacteria *Clostridium botulinum* se presentan en las conservas mal esterilizadas, en embutidos por la acción de cambios bruscos de temperatura, esta es una de las sustancias más venenosas que se conocen (miles de veces más tóxica que el cianuro), además, también microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella spp* que se presentan en los alimentos debido a las malas condiciones sanitarias a lo largo de toda la cadena de producción” (Cortés, 2018).

Teniendo en cuenta la problemática antes mencionada se debe buscar alternativas para evitar el uso de aditivos químicos y el deterioro de los alimentos por acción de microorganismos, siendo los bioconservantes una opción atractiva para la industria alimenticia, pues la nisina generada por el metabolismo de microorganismos BAL (bacterias ácido lácticas), el aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y el ahumado presentan actividad bactericida que pueden contribuir a garantizar la inocuidad y seguridad alimentaria de distintos productos que permita mitigar enfermedades que pueden ser transmitidas por alimentos. De esta manera se pregunta la siguiente pregunta de investigación:

- ¿Cómo influye la aplicación del ahumado, nisina y aceite esencial del clavo de olor como bioconservadores en la salchicha Frankfurt?

Hipótesis

Hipótesis Nula

La aplicación del ahumado, la nisina o el aceite esencial de clavo de olor no tendrá efecto bioconservador sobre parámetros microbiológicos y sensoriales de la salchicha Frankfurt.

Hipótesis Alternativa

La aplicación del ahumado, la nisina o el aceite esencial de clavo de olor si tendrá efecto bioconservador sobre parámetros microbiológicos y sensoriales de la salchicha Frankfurt.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Evaluar la capacidad bioconservante del ahumado, nisina y del aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) sobre la salchicha Frankfurt.

Objetivos Específicos

- Formular una salchicha Frankfurt, incorporando nisina, aceite esencial de clavo de olor y ahumado para determinar el poder bioconservador en los diferentes tratamientos usados.
- Determinar la composición proximal de la salchicha Frankfurt, para verificar que cumpla con las especificaciones y requerimientos establecidos para productos cárnicos.

- Evaluar los parámetros microbiológicos del poder bioconservante del ahumado, nisina y aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) sobre una salchicha Frankfurt, durante 20 días de almacenamiento a 8°C.
- Valorar sensorialmente la salchicha Frankfurt en combinación con la nisina, aceite esencial de clavo de olor y ahumado a fin de seleccionar el mejor método de bioconservación a nivel organoléptico.

1. CAPÍTULO I. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

1.1. Antecedentes

Algunas investigaciones previas pertenecientes a artículos científicos de las revistas más importantes de alimentos y de la agroindustria, hacen mención al uso de la nisina, aceite esencial de clavo de olor y ahumado como método de conservación de diferentes alimentos, obteniendo resultados positivos que prometen ser una alternativa viable para evitar el uso de sales nitrificantes, los mismos se detallan a continuación:

Domínguez en 2020, cuyo tema de investigación fue “*Evaluación del efecto antimicrobiano de la nisina como conservante natural en carne molida especial para hamburguesas*”, en esta investigación se evaluó el efecto antimicrobiano de diferentes niveles de nisina (0,1, 0,2 y 0,3%) frente a un testigo, en carne molida para hamburguesa almacenada en refrigeración durante 15 días para evaluar el tiempo de vida útil del producto. “En el análisis sensorial el tratamiento T3 (0.3% de nisina) fue el de mayor aceptación, puesto a que obtuvo altos puntajes en sus características organolépticas. En cuanto al contenido microbiano a los 11 días de almacenamiento se evidenció el efecto antimicrobiano de la nisina ya que en los tratamientos con nisina se determinó ausencia de *Escherichia coli*, *Staphylococcus*

aureus, y menores cantidades de aerobios mesófilos. En el análisis bromatológico el tratamiento con 0,3% de nisina presentó alto contenido de proteína de 24,64%, y baja cantidad en grasa 0,87%, constituyendo un producto nutritivo y saludable apto para el consumo humano” (Domínguez, 2020).

Beltran en 2020 realiza la investigación titulada “Inclusión de aceite esencial de orégano y nisina encapsulados en biorecubrimiento comestible a partir de quitosano como alternativa de conservación salchicha Frankfurt colágeno”, se demostró que “tanto nisina como AEO encapsulado presentan gran capacidad de inhibición frente a los microorganismos evaluados *Clostridium perfringens* y *E. coli* O157:H7 por lo cual la formulación escogida para trabajar con alimentos fue: 250 UI/mL concentración de nisina, 2% p/v concentración de quitosano y 0.50 %v/v concentración de AEO encapsulado” (Beltran, 2020).

Landinez & Soledispa (2020) evalúan la aplicación de aceites esenciales como conservantes en la elaboración de chorizo cuencano, en efecto se hizo uso de aceite esencial de clavo de olor en concentraciones de 150 ppm, 300 ppm y 600 ppm, además de unos cuatro grupos sin aceite esencial para realizar la comparación. Al realizar los análisis físico químicos y microbiológicos al chorizo cuencano según los requisitos de las normas INEN 1338:2012 CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS PRODUCTOS CÁRNICOS COCIDOS se determinó que el chorizo cuencano cumplió con los requisitos dispuestos como es los microbiológicos Aerobios mesófilos (2.0×10^2), *Escherichia coli* (<10), *Staphylococcus aureus* (<10), *Salmonella* (Ausencia), los físico químicos humedad (50.00 ± 0.60), proteína (16.90 ± 0.7), cenizas (1.84 ± 0.06), grasa (31.26 ± 1.28); aunque el grado de grasa

debe disminuir en 2% para este en el rango permitido por la normativa (Landinez & Soledispa, 2020).

González & Rojas en 2018, realizaron una investigación cuyo tema fue “Evaluación de la capacidad antimicrobiana de la especia Clavo de olor (*Syzygium spp.*) en aceite esencial en un producto cárnico madurado frente a microorganismos criterio microbiológico según la NTC 1325”, los autores concluyeron que la concentración de aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium spp.*) que tuvo mayor efectividad en el control de los microorganismos criterio microbiológico estipulados en la NTC 1325 fue la de 2,5% porque fue la que permitió obtener recuentos negativos en el análisis microbiológico del producto cárnico madurado para las bacterias: *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*; el único microorganismo que creció en presencia de las dos concentraciones de clavo de olor y de los nitritos fue *Clostridium spp.* (Gonzales & Rojas, 2018).

Aguas (2020), realiza el estudio de las características organolépticas y físico-químicas del embutido de conejo, macerado con especias Amazónicas y ahumado, con maderas del Oriente Ecuatoriano. “El estudio fue realizado con el factor A: concentración de especias (culantro sachá 50% y 50% ajo sachá, culantro sachá 40% y 60% ajo sachá, culantro sachá 60% y 40% ajo sachá) y factor B: tipos de maderas (guaba y guayaba) a las cuales se ejecutó el análisis sensorial para determinar el mejor tratamiento, para tabular los datos obtenidos en la prueba organoléptica se empleó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis cuyos resultados indicaron que los tratamientos tuvieron diferencias significativas, los

resultados de las pruebas sensoriales se encontró que el mejor tratamiento fue T2 de código A1B2 (50% de culantro de sachá y 50% ajo sachá; y ahumado con la madera de guayaba) con la valoración de total 14. Se efectuó análisis físico-químicos obteniendo los siguientes resultados: grasa 9,98%; proteínas 18,11%; cenizas 5,03%; pH 6,75 y los análisis microbiológicos fueron; levaduras 0 UFC; hongos <0 UFC; *Coliformes totales* <1 UFC y *E. Coli* nada, cumplen con requerimientos para carnes ahumadas de la norma INEN 1347, cumpliendo con la norma establecida” (Aguas, 2020).

1.2.Salchicha Frankfurt

1.2.1. Características de salchicha Frankfurt tradicional

Arancibia y Calderón (2018) dicen que “las salchichas se encuadran dentro del grupo de productos cárnicos tratados por calor, que se definen como productos cárnicos picados, fabricados con carne y grasa, embutidos en tripa natural o artificial, que se puede conservar o eliminar tras la cocción, y cuyo calibre máximo es de 45 mm de diámetro”.

Tal como mencionan los autores, “las Frankfurt, estudiadas en este comparativo, son salchichas cocidas de carne de cerdo o de otros animales de abasto, cerdo y aves y grasa (tocino o panceta y corteza de cerdo)” (Arancibia y Calderón, pág 15). Otros ingredientes son el agua procedente de la carne y el que se añade en la fase de picado, la sal y mezclas de especias o condimentos. Así mismo, acostumbran contener leche en polvo, almidón o fécula de patata, azúcar, proteínas no cárnicas (lácteas o de soja) y aditivos (Arancibia y Calderón, 2018).

Aranciba y Calderon en 2018 mencionan que “el proceso de elaboración comienza con el picado: máquinas que van cortando y picando los ingredientes hasta obtener una masa con el granulado deseado. A esta masa se le añade agua o hielo, y, opcionalmente, ingredientes y aditivos para favorecer la fijación de agua y la estabilidad de la masa, una vez embuchada la masa en la tripa, se cuece o escalda, tras la cocción, en algunos casos se retira la tripa en la que ha sido embutida”. Posteriormente, pueden ahumarse, aunque este ahumado puede preceder a la cocción final.

Finalmente, se envasan al vacío, se almacenan y distribuyen, para garantizar el correcto estado higiénico sanitario del producto, en el proceso de distribución no debe romperse la cadena de frío, los paquetes de salchichas pueden hincharse debido a la producción de CO₂, en general por bacterias lácticas heterofermentativas (Alvis et al., 2017).

Eso ocurre cuando la cubierta es elástica e impermeable a los gases. El color rojo de los embutidos puede palidecer y transformarse en un gris yesoso que se ha atribuido al oxígeno y a la luz y puede ser acelerado por las bacterias. Las "coloraciones anilladas del frío" se han atribuido a oxidación, producción bacteriana de ácidos orgánicos o sustancias reductoras, a una cantidad excesiva de agua y a un tratamiento térmico insuficiente. Las bacterias reductoras de los nitratos dan lugar a la formación de gas (óxido nítrico) (Alvis et al., 2017).

1.2.2. Conservación de salchichas

El curado de las carnes se limita a las de vacuno y cerdo, tanto picadas como cortadas en piezas (como jamones, ancas, cabeza, costillas, lomos y panceta del

cerdo y pierna y pecho del vacuno). Originalmente, el curado se practicaba para conservar las carnes saladas sin refrigeración, más actualmente la mayoría de las carnes curados llevan además otros ingredientes y se conservan refrigeradas, y muchas se ahuman, por lo que son también, hasta cierto punto desecadas (Yong et al., 2021).

Los agentes del curado permitido son: cloruro sódico, azúcar, nitrato sódico, nitrato sódico y vinagre, pero suelen usarse en general los cuatros primeros. Las funciones que tales productos cumplen son las siguientes: El cloruro de sodio o sal común se usa preferentemente como conservador y agente que contribuye al sabor (Amaya, 2017).

“La salmuera en que se introduce la carne durante el curado suele tener una concentración de cloruro sódico del 15%, en contraste con la que se le inyecta, que tienen mayor concentración, aproximadamente al 24 %. Su principal objeto es bajar la actividad acuosa(a_w)” (Krasulya et al., 2019, pág, 21).

El azúcar, aparte de dar sabor, sirve también como material energético para las bacterias que reducen los nitratos en la solución de curados. Se emplea principalmente la sacarosa, pero puede sustituirse por glucosa si se lleva a cabo un curado más corto, e incluso puede suprimirse el azúcar. El nitrato sódico actúa indirectamente como fijador del color y es ligeramente bacteriostático en solución ácida, especialmente contra los anaerobios. Sirve también como material de reserva a partir del cual las bacterias reductoras pueden originar nitritos durante un curado largo. El nitrito sódico sirve de fuente de óxido nítrico, que es el verdadero fijador

del color, poseyendo también cierto poder bacteriostático en solución ácida (Ricaurte y Zambrano, 2022).

1.2.3. Aditivos alimentarios:

Con la finalidad de conseguir una vida de anaquel prolongada o mejorar características organolépticas son añadidos los aditivos alimentarios, los cuales son sustancias tienen como propósito ayudar al alimento en cuanto a coloración, conservación, entre otros (Escalante, 2020).

1.2.3.1. Clasificación de los aditivos alimentarios:

Los aditivos alimentarios fueron clasificados por la FDA, siendo así que según la Administración de Alimentos y Medicamentos se clasifican en (Manivel y Villagómez, 2019):

- Aditivos para mejorar o conservar la seguridad y frescura de los alimentos conservadores y antioxidantes.
- Aditivos para mejorar o mantener el valor nutricional, vitaminas y minerales.
- Mejoradores de sabor, textura y apariencia, saborizantes, edulcorantes, espesantes, etc.

1.2.4. Conservación de alimentos

Para la conservación o preservación de alimentos se pueden usar métodos tanto físicos como químicos; los métodos físicos son muy variados pues entre ellos tenemos: ahumado, congelación, deshidratación, esterilización, pasteurización y refrigeración, los cuales al ser procedimientos naturales resultan inocuos para las

personas; generalmente los alimentos suelen necesitar la combinación de estos métodos físicos con agentes químicos que usualmente son sintéticos y perjudiciales para la salud, entre los métodos químicos se encuentran los preservantes químicos cuya función es la de proteger al alimento de agentes microbianos e impedir su desarrollo y proliferación, en base a éste principio los conservantes químicos suelen ser bactericidas o fungicidas dependiendo de su accionar, además evitan el detrimento de aceites y grasas, el pardeamiento enzimático o no enzimático desagradable en el alimento (Escalante, 2020).

1.2.5. Aditivos para la conservación de alimentos

Dentro de la industria alimentaria se utilizan aditivos alimentarios. Usualmente, son sustancias que se utilizan en la industria junto a distintos métodos físicos de conservación con el fin de lograr una inocuidad del alimento y prolongar la vida de anaquel del mismo (Arancibia y Calderón, 2018).

Estas sustancias son adicionadas a los alimentos para que puedan ser consumidos por un mayor periodo de tiempo; cuyo principio se basa en prevenir e impedir el desarrollo, crecimiento y proliferación de bacterias, hongos y levaduras; la efectividad de los conservantes va a depender de ciertos factores como la especificidad de acción, composición del alimento y manipulación del producto terminado (Rojas y Vargas, 2008).

Además, en lo concerniente a alimentos bebibles se suele usar el dióxido de azufre para evitar que levaduras, bacterias o mohos produzcan fermentaciones innecesarias y desagradables, también impide el pardeamiento enzimático y no enzimático (Escalante, 2020).

1.3.Nisina

Según Sánchez et al., (2019) “La nisina es un antibiótico policíclico y peptídico, que se utiliza habitualmente como bioconservante, y es sintetizada de forma natural por *Lactococcus lactis*.” (p.168)

La nisina es un antibiótico que suele ser utilizado en la industria de alimentos como una sustancia conservadora, puede ser un conservante como prevención de las alteraciones de la misma forma influye en la protección de carne ya sea esta precocinada o cruda (Sánchez et al., 2019).

“La nisina detiene la posible aparición de microorganismos en los alimentos, los costos de las materias primas son altos, por lo que el uso de cultivos microbianos productores de bacteriocinas puede ser una alternativa importante para mejorar la calidad y la seguridad de los alimentos, manteniendo bajos los costos de producción” (Castro et al., 2009).

1.3.1. Bacteriocina

1.3.1.1.Definición y características de las bacteriocinas

Las bacteriocinas se definieron a modo general como un grupo de sustancias antimicrobianas de origen bacteriano, caracterizadas por la adsorción a receptores de membrana específicos; la actividad intraespecífica y la biosíntesis letal. Estudios posteriores acerca de las colicinas evidenciaron que estas sustancias se caracterizaban, además, por poseer un componente proteico biológicamente activo; ejercer un modo de acción bactericida y por la localización plasmídica de los

determinantes genéticos que codifican su producción e inmunidad (Castillo y Lobos, 2020).

1.3.1.2. Bacteriocinas derivadas de bacterias ácido lácticas

“Las bacteriocinas de bacterias ácido lácticas son un grupo heterogéneo de sustancias antimicrobianas de origen peptídico, varias de ellas no han sido completamente caracterizadas aún. Por tanto, otros autores sugieren que no se puede establecer propiedades en común de todas, sin embargo, las propiedades que principalmente se tienen en cuenta son las siguientes: naturaleza, tamaño molecular, composición aminoacídica y estructura química, termorresistencia y estabilidad frente a pH. Aunque por definición las bacteriocinas son sustancias de naturaleza proteica, se han descrito algunas que presentan en su molécula componentes glucosídicos y/o lipídicos, además de una fracción proteica” (Soltani et al., 2021).

Las bacteriocinas producidas por las bacterias ácido-lácticas se caracterizan por ser, generalmente, estables a valores de pH ácidos o próximos a la neutralidad, lo que indica la adaptación de estas sustancias a condiciones ambientales de los sustratos en los que se desarrollan las bacterias productoras (Juturu y Chuan, 2018). La termorresistencia es una característica muy extendida entre las bacteriocinas de las bacterias lácticas, dependiendo de una serie de factores como el grado de purificación de las bacteriocinas, la presencia de moléculas termoprotectoras y el pH. La termoestabilidad disminuye cuando los tratamientos térmicos se realizan con las bacteriocinas purificadas parcialmente o a homogeneidad, como se ha comprobado con la lactacina B, la carnocina U – 149, y la sakacina P, entre otras. Debido a su naturaleza peptídica, las bacteriocinas pueden ser degradadas por

enzimas digestivas, resultando inocuas para el hombre y su microbiota intestinal. Además, sus propiedades fisicoquímicas les dan resistencia a tratamientos térmicos y debido a su pequeño tamaño pueden difundir con relativa facilidad en los alimentos (Kumariya et al., 2019).

1.4.Clavo de olor (*Syzygium aromaticum*):

1.4.1. Origen

El clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) es proveniente de varias islas de Asia del Sur, el cual ha sido adaptado y cultivado a distintas partes del globo terráqueo; por lo que se conoce a esta especie vegetal con distintos nombres comunes dependiendo de la región, como por ejemplo clavero (Vicidomini et al., 2021).

Figura 1. *Clavo de Olor*



Fuente: (Martínez, 2021).

1.4.2. Descripción taxonómica

En términos botánicos toda planta descubierta tiene su respectiva descripción taxonómica. Vicidomini et al, (2021) detallan que la descripción taxonómica del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) es:

- **División:** Magnoliophyta.
- **Clase:** Magnoliopsida.
- **Subclase:** Rosidae.
- **Orden:** Myrtales.
- **Familia:** Myrtaceae.
- **Género:** *Syzygium*
- **Especie:** *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. G.L.M. Perry.
- **Sinonimia:** *Eugenia caryophyllata* L.

1.4.3. Descripción botánica

El clavero comúnmente conocido tiene como nombre científico *Syzygium aromaticum* lo que le permite ser reconocido en todo el planeta. Se trata de un árbol perenne caracterizado por presentar una altura cercana a los 15 m; hojas simples, ovado-oblongas, lisas y brillantes de 5-12 cm de largo; flores púrpuras, con una longitud de 1-1.75 cm agrupadas de a tres en cimas compactas ubicadas en el extremo de las ramas; yemas tiernas rosadas; frutos rojizos o amarillo-pálidos, en forma de baya alargada de 1-2 cm de largo; la planta florece cada 2-3 años (Escalante, 2020).

1.4.4. Composición química

La composición química del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) varía de acuerdo a la parte de la planta en estudio, por lo general sus componentes son los mismos, pero se diferencian en su concentración. Los principios activos principales son (Aguilar y López, 2017):

Eugenol: Sustancia natural que ha sido aislada de diferentes plantas aromáticas como la canela, la nuez moscada y la albahaca, pero que la planta fuente por excelencia es el clavo de olor (45 – 90% del total de su composición). “A este compuesto químico natural se le han demostrado efectos antimicrobianos (frente a hongos, bacterias y virus), antiinflamatorio, analgésico, antioxidante, antitumoral y previene diabetes” (Teixeira & otros, 2018). *El eugenol tiene una mayor efectividad frente a bacterias Gram negativas (a pesar de que se ha reportado resistencia por parte de E. coli), esto es debido a la afinidad del eugenol por los lipopolisacáridos (rompe las cadenas entre monómeros y aumenta la permeabilidad de la membrana)* (Nonsee, Supitchaya, & Thawien, 2018) “los cuales se encuentran en mayor cantidad en este grupo de bacterias, y al tener las bacterias Gram-positivas mayor contenido de peptidoglicano no son blanco del eugenol” (Abdali & Aji, 2015). Este compuesto químico producido por células vegetales inhibe la producción de enzimas extracelulares como amilasas y proteasas, lo que produce una elevada tasa de lisis celular (García & García, 2018).

Carvacrol y timol: Estos compuestos actúan como desacopladores de membrana en la célula bacteriana (Armas, Márquez, & Pretell, 2011). Nonsee, Supitchaya, & Thawien (2017) afirman que el mecanismo de acción está dado por

una desnaturalización de las 21 proteínas y también por una reacción con los fosfolípidos de la membrana celular, de tal manera que se produce un desequilibrio osmótico con la subsecuente muerte celular. Otros blancos de estos compuestos de origen natural son las rutas metabólicas, síntesis de proteínas y el sistema genético; por ejemplo, se observó que las bacterias expuestas a concentraciones menores a las letales de estos dos compuestos producen “cambios en la concentración de los ácidos grasos de la membrana celular, presentándose un aumento de los ácidos grasos insaturados”. También se ha demostrado un efecto sobre la filtración del contenido celular, la coagulación del citoplasma y la disminución de la fuerza motriz (García & García, 2018).

1.4.5. Mecanismo de acción del clavo de olor

La forma en que actúa el clavo de olor está basada en una sinergia de sus compuestos químicos y sus metabolitos, los cuales se encargan de deteriorar e inactivar sistemas enzimáticos claves en la síntesis de paredes, membranas, respiración celular y producción de energía (Armas, Márquez, & Pretell, 2011). La efectividad del clavo de olor como antimicrobiano depende principalmente de la concentración de los compuestos fenólicos, pues, se comprobó que son estos los principales actores en la actividad antimicrobiana del clavo de olor, sin embargo, los mecanismos exactos de los compuestos fenólicos no han sido determinados (Nonsee, Supitchaya, & Thawien, 2019).

Los aceites esenciales son de naturaleza hidrófoba, lo cual brinda ventaja frente a muchos antibióticos que no poseen la facilidad de penetrar el periplasma de las bacterias Gram negativas a través de proteínas de la membrana externa, y de esta manera efectuar acciones como la coagulación del contenido intracelular (Ramírez, 2020).

“Los aceites esenciales de origen vegetal poseen la capacidad de afectar las proteínas presentes en la membrana citoplasmática, lugar en el que se hallan las enzimas ATPasas, siendo estas vulnerables al efecto de las moléculas lipídicas dando como resultado una disminución en el potencial energético de la célula y falla en la síntesis de componentes estructurales” (Escalante, 2020).

1.5.Ahumado

1.5.1. Historia del ahumado

La conservación de los alimentos por el ahumado es muy antigua; fue utilizada por los egipcios aproximadamente en el año 2000 a.C. en su significación original “curación” significaba “salvación” o “conservación”. Los procesos de curación de los alimentos incluyen procesos de conservación tales como: la desecación, el salado y el ahumado (Altamirano et al., 2021)

1.5.2. Definición del ahumado

El ahumado es un proceso en el cual es sometido al alimento a una deshidratación, por la acción del humo y el aire seco que provoca, un sabor especial ya que selecciona maderas previamente que este les brinda sus características organolépticas (Torres N., 2017) mientras que (Zaldumbide, 2019) define que las

carnes y pescados pueden ser tratados con sal de cocina, la cual los deshidrata y evita el ataque de gérmenes, actuando como antiséptico y protegiendo los alimentos.

1.5.3. Ventajas del ahumado:

- Conserva los alimentos por más tiempo
- Tiene buena apariencia el alimento
- Disminuye la grasa
- En un mecanismo para evitar la contaminación provocada por bacterias y hongos.

1.5.4. Desventajas del ahumado:

- Reduce el tamaño o peso de la proteína
- El tiempo empleado es amplio
- Al usar sales se incrementa el sodio en los alimentos (sal)
- No en todos los casos eliminan microorganismos patógenos.

1.5.5. Tipos de ahumado

A continuación, definiremos las principales técnicas de ahumado y sus características.

1.5.5.1. Ahumado frío:

Los productos cárnicos que se ahúman en frío pueden ser tratados mediante curado en seco y salmuera. “Las consistencias siempre serán, para las carnes, crudo-curado ya que la temperatura no se elevará. En la mayoría de los casos las carnes ahumadas

en frío luego de este proceso son sometidas a un periodo de maduración donde finaliza su elaboración cumplida el mismo” (García, 2018).

El resto de productos ahumados en frío, especias, sales, té, yerba mate (una de mis preferidas), quesos, crema ácida, aceites, etc. *Siempre después del ahumado en frío procuraremos realizar un periodo de reposo de los productos para que aquellas sustancias de la combustión que se transfirieron se redondeen y suavicen* (Altamirano et al., 2021). No es aconsejable consumir los productos recién ahumados, normalmente el reposo se complementa entre las 24 y 48 horas y para productos que tuvieron exposiciones más prolongadas se recomienda de tres a cuatro días (Torres N., 2017).

1.5.5.2. Ahumado caliente

“Es el proceso que se emplea en la mayor parte de los productos, la temperatura de trabajo en este tipo de ahumados está en el rango de los 50° a 62°C, el proceso de ahumado en este caso lleva menos tiempo que en el tipo anterior, los tiempos de exposición varían de entre 2 a 3 horas para los pescados y de 8 a 12 horas para las carnes” (Altamirano et al., 2021).

1.5.5.3. Ahumado por fricción

Zaldumbide, 2019 menciona que el humo se produce por fricción de un dispositivo metálico con nervaduras accionado con un motor eléctrico que gira a determinada velocidad a la vez que va prensando el trozo de madera colocado. “Debido a la fricción la madera comienza a alcanzar temperaturas de 260°C a 360°C, el humo se logra a los 3-5 segundos” (Escalante, 2020).

2. CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.Modalidad o enfoque de la investigación

La presente investigación tuvo como objetivo determinar el poder conservante del ahumado, nisina y clavo de olor en la formulación de la salchicha Frankfurt, mediante análisis microbiológicos que fueron reportados como datos cuantitativos expresados en (ufc/g) esto de acuerdo a la Norma Técnica INEN 1338:2016. De igual manera, se realizó un análisis organoléptico a los 0 días y 20 días con el fin de determinar las características cualitativas del producto, siendo el enfoque de la investigación de carácter mixto.

2.2.Tipo de investigación

2.2.1. Investigación experimental

Según Galarza Carlos (2021), consiste en obtener datos por medio de la experimentación con la finalidad de determinar las causas y/o los efectos de los fenómenos en estudio.

La investigación es experimental ya que se realizó un análisis microbiológico donde se obtuvo conteos de colonias en ufc/gr presentes en las muestras del alimento formulados (salchicha Frankfurt) para Aerobios mesófilos,

E. coli y *Staphylococcus aureus* para poder determinar el efecto bioconservador frente a estos microorganismos.

2.2.2. Investigación exploratoria

Según Morales Nelson (2015), es un estudio que busca ampliar la visión general acerca de una determinada realidad.

Como planteamiento del proyecto de investigación se busca la creación de nuevas alternativas de bioconservación de salchichas Frankfurt permitiendo así tener una visión más amplia de la capacidad de reducir el crecimiento de microorganismos que tiene la nisina, el clavo de olor y el ahumado.

2.2.3. Investigación bibliográfica

Según Flores y Franco (2016), consiste en conseguir, elegir, recolectar, establecer y analizar la información sobre un proyecto realizado a partir de fuentes bibliográficas como: libros, documentos de archivo, tesis y artículos científicos.

La investigación se basó en la búsqueda documental de artículos científicos de alta relevancia y en consecuencia con el tema de investigación donde la observación está presente en el análisis, identificación, selección y articulación con el objeto de estudio.

2.3. Métodos de investigación

2.3.1. Inductivo

Según Fernández Aranxta (2017), es un argumento cuya premisa que asemeja patrones de los que se extrae una conclusión general.

A través de este método se logró establecer entre la nisina, clavo de olor y ahumado ejerce el mayor poder bioconservador para la formulación de una salchicha Frankfurt, además llegar a conclusiones obtenidos de los análisis de los tratamientos propuestos.

2.3.2. Deductivo

Según Prieto Bayron (2017), el método deductivo donde se deduce de manera de premisa las conclusiones.

Este tipo de método ayuda a entender de mejor manera la calidad microbiológica en base a la Norma Técnica INEN 1338:2016 para la salchicha Frankfurt frente a los diferentes bioconservadores usados.

2.4. Técnicas de investigación

Según Maya Ester (2017), detalla que las técnicas más utilizadas son: la observación, las fichas, en las cuantitativas la recopilación de datos estadísticos.

2.4.1. Observación

Se hace uso de esta técnica debido a que se realiza un análisis sensorial, el principal atributo a considerar es el color de la salchicha Frankfurt.

2.4.2. Recopilación de datos estadísticos

Se hace uso de esta técnica debido a que se cuantifica el crecimiento bacteriano en ufc/gr, para los siguientes microorganismos (*Aerobios mesófilos*, *Staphylococcus aureus* y *E coli*), esto con la finalidad de determinar el poder

bioconservador que tiene el uso de nisina, aceite esencial de clavo de olor y ahumado, en la salchicha Frankfurt.

2.5. Instrumentos de investigación

El instrumento de investigación usado en la presente investigación es la ficha de catación, la misma que evaluó los siguientes parámetros: olor, color, sabor y aceptabilidad, con el fin de determinar que tratamiento es el que más gusto al panel de catadores, la ficha de catación se puede observar en el *Anexo 9*.

2.5.1. Formulación de la salchicha Frankfurt

Para la formulación de la salchicha Frankfurt se utilizó como referencia la matriz de formulaciones de embutidos de pasta fina del departamento de desarrollo e investigación de la empresa Embutser, como se muestra en la *tabla 1*.

Tabla 1. Formulación de la salchicha Frankfurt

INGREDIENTES	% Fórmula
Carne de res	41.7
Grasa	16.7
Pulpa de pollo con piel	16.7
Proteína aislada de soya	1.7
Almidón de papa	2.50
Carragenina (0,2 a 1%)	0.50
Agua	16.7
Sal	2.0
Fosfato	0.42
Eritorbato	0.02
Ajo en polvo	0.03
Comino	0.02
Pimienta Negra	0.08
Pimienta blanca	0.00
Glutamato monosódico	0.07
Sabor freír	0.01
Sorbato	0.05
Provian D (0,7 a 1 %)	0.83
Total	100.0

Fuente: (Guanochanga, 2022)

2.5.2. Proceso de elaboración de la salchicha Frankfurt

2.5.2.1.Recepción de las materias primas cárnicas

La materia prima cárnica usada para la elaboración del producto fue proporcionada por la granja Ecuapork S.A, para la recepción de la misma se verificó las siguientes condiciones:

Inspección visual para determinar las características organolépticas (olor, color, apariencia), presencia de materiales extraños, tejidos desgarrados, etc.

Temperatura de recepción de 0°C a 4°C, pH de 5.80 a 6.40.

“En esta etapa es importante determina si la materia prima cárnica recibida presenta condiciones de carne PSE (pálida, suave y exudativa) al producirse una bajada brusca de pH en la canal cuando la temperatura todavía se encuentra entorno a los 37°C (temperatura que tenía el animal en vivo), se produce la desnaturalización de las proteínas: esto hace que no sean capaces de retener agua, y que ésta salga al espacio intercelular o carne DFD (oscuro, secas y firmes) el glucógeno puede llegar a agotarse en situaciones de stress para el animal a consecuencia de un aumento en la glucógenolisis y la lipólisis” (Flores, 2020). La carne de vacuno no presenta problemas PSE debido a la lenta velocidad de acidificación.

2.5.2.2.Troceado y molido

En el proceso de troceado lo que se pretende es fraccionar la carne y la grasa en raciones más pequeñas para que la etapa de molienda sea más sencilla y durante este último proceso (molido) se busca obtener una masa homogénea. La temperatura es una condición importante a cuidar durante el proceso de molido; el

mantener la carne de res a temperaturas de refrigeración ayuda a disminuir el crecimiento microbiano y se reduce la oxidación de la mioglobina lo cual también propicia estabilidad en el color rojo característico de la carne. Para la elaboración de salchichas, la carne y la grasa molieron por separado, en disco de 5 mm.

2.5.2.3.Cuteado

Para la elaboración de las emulsiones cárnicas de pasta fina para productos escaldados, se realizó en la cutter marca Titan 23 con capacidad de Kg, durante 15 minutos a 1500 rpm, hasta obtener una masa homogénea. En el cutter se hizo la mezcla de materia prima y adición de clavo de olor o nisina dependiendo del tratamiento, especias y saborizantes.

2.5.2.4.Embutido

Para el proceso de embutido se utilizó una embutidora hidráulica con capacidad para 20 Kg de masa, se usó la tripa de colágeno con un calibre de 20 mm y largo de 20 cm cada unidad. Posteriormente se dio el proceso de cerrado o amarrado (mediante el cual se cerraron las puntas de la tripa en cada salchicha para evitar la salida de la masa) y/o un proceso de retorcido (en el cual se cerraron las puntas de cada salchicha retorciendo la tripa entre una y otra).

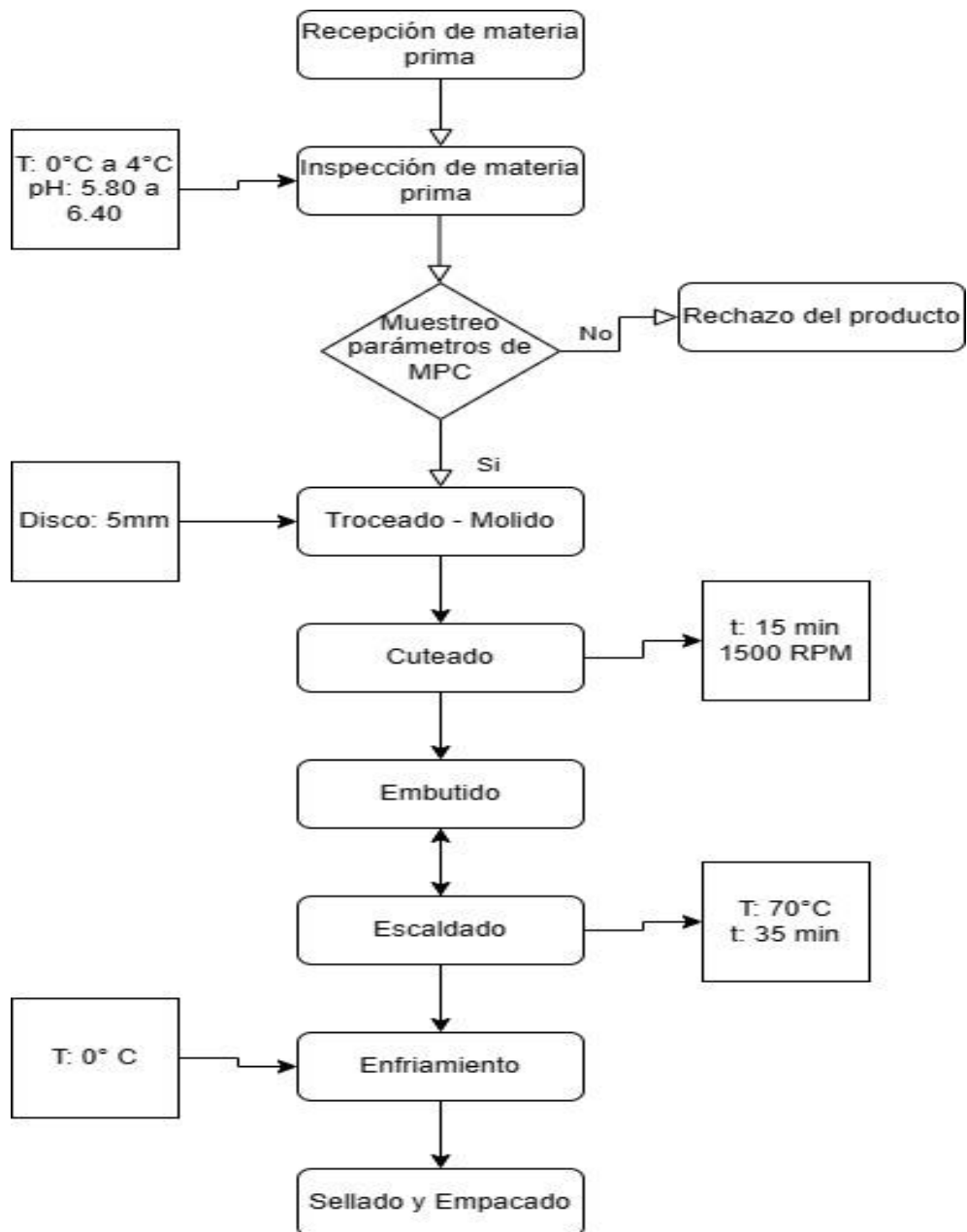
2.5.2.5.Escaldado y enfriado

El producto fue sometido a cocción en una marmita con capacidad para 400 litros de agua a temperaturas de 76°C a 80°C, hasta que se alcanzó una temperatura interna de 70 grados, durante 35 minutos y luego fueron enfriados en una tina de agua helada a una temperatura de 0°C por inmersión en agua.

Este tratamiento presentó gran influencia en la textura del producto, también cambió el color de la carne, favoreció la digestión, inhibió la acción enzimática y el crecimiento microbiano, en este proceso, la temperatura interna del producto debe ser mayor a 72 °C, por un tiempo de 15 minutos antes del enfriamiento o choque térmico que de acuerdo con este último debe ser en agua con hielo, por 5 a 10 minutos. El proceso de enfriamiento se realiza entre otros para eliminar los microorganismos y de este modo prolongar la vida útil del producto.

2.5.2.6. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de Salchicha Frankfurt

Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de Salchicha Frankfurt



Elaborado por: (Guanochanga, 2022)

2.6. Análisis proximal

Los análisis correspondientes al contenido de humedad, proteína, grasa, sal y cenizas de la salchicha Frankfurt, se realizaron en un laboratorio externo denominado Seidlaboratory acreditado conforme a la NTE INEN ISO/IEC 17025:2018 a nivel nacional y conforme a la ISO/IEC 17025:2017 a nivel internacional con el fin de determinar la calidad nutricional de este alimento, resultados que se pueden observar en la *Tabla 4*.

2.6.1. Determinación del contenido de humedad

Para el cálculo de la humedad se realiza en base al método adaptado por la AOAC 950.46 donde se aprovecha la alta tensión de vapor que tiene el agua entre las temperaturas de 100°C a 102°C con lo que el proceso de difusión molecular que gobierna el secado se lleva a cabo rápidamente (Huertas, 2019).

2.6.2. Determinación del contenido de proteína

La metodología y teoría del método está basado en la técnica Kjeldahl de cuantificación de N proteínico por transformación en NH₃ y luego titulación con un ácido. La técnica en sí es una modificación del método AOAC 990.03 (Huertas, 2019).

2.6.3. Determinación del contenido de grasa

Está basado en el método de SOXHLET de extracción de sustancias solubles en éter etílico de muestras previamente secadas por goteo continuo del solvente sobre la muestra, se sigue el método adoptado por la AOAC 991.36 (Huertas, 2019).

2.6.4. Determinación del contenido de sal

El método AOAC 991.11 donde para determinar el contenido de sal se prepara la solución de 1 mg Na/mL (1000 ppm), se secó NaCl puro (1 g de NaCl contiene 0,393376 g Na+) por 2 h a 110 °C hasta peso constante, enfriando en desecador. Posteriormente se pesó 2,5421 g en matraz volumétrico de 1 L, diluyendo a volumen con agua destilada desionizada (Huertas, 2019).

2.6.5. Determinación del contenido de cenizas

Basado en el método AOAC 920.153 donde por medio de la destrucción a alta temperatura (600 °C) de la materia orgánica, en medio oxidante quedando un residuo estable, a este se le conoce como cenizas (Huertas, 2019).

2.7. Análisis microbiológico

En base a la Norma Técnica INEN 1338:2016 se realizó las siembras microbiológicas para los siguientes microorganismos: *Aerobios mesófilos*, *Escherichia. coli*, *Staphylococcus aureus*, a continuación, se detalla en protocolo a seguir para cada uno de los microorganismos citados.

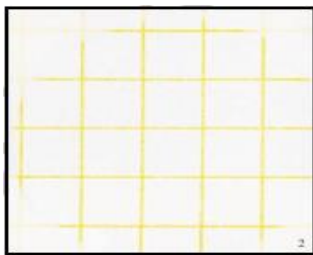
2.7.1. Metodología para el análisis de Aerobios mesófilos

Se estableció en base al instructivo para el correcto recuento de Aerobios Mesófilos en productos, según el método AOAC OMA 990.12, utilizando placas Petrifilm 3M, cuyo procedimiento se encuentra detallado en el apartado de *anexas*.

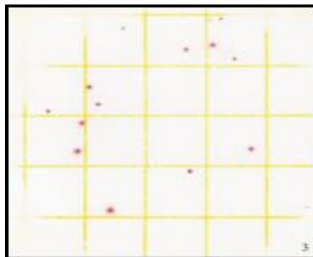
2.7.1.1. Interpretación de resultados:

Una vez retiradas las placas de la incubadora y se contaron las colonias de microorganismos que aparecen como puntos rojos/violetas marcando los puntos con un esfero o marcador que no sea rojo. A continuación, se detalla los diferentes casos para la interpretación de estas placas:

Figura 3. Recuento de colonias de *Aerobios mesófilos*



Recuento = 0 Es fácil interpretar la placa Petrifilm



Recuento = 16 Recuento de Aerobios, con pocas colonias bacterianas.



Recuento = MNPC Recuento de Aerobios con un número de colonias demasiado numeroso para el recuento (MNPC).

Elaborado por: (Guanochanga, 2022)

El límite tolerable para *Aerobios mesófilos* es de $< 5 \times 10^5$ ufc/g (Norma Técnica INEN 1338,2016).

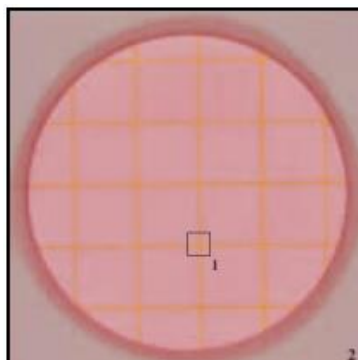
2.7.2. Metodología para el análisis de *Escherichia. Coli*

Para el correcto recuento de *E. coli* totales mediante el método AOAC 991.14 para análisis de productos, utilizando placas Petrifilm 3M, el procedimiento de siembra se encuentra en *anexos*.

2.7.2.1. Interpretación de resultados:

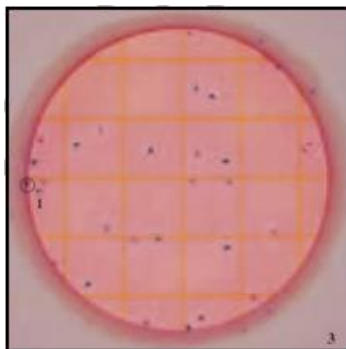
Se retiraron las placas de la incubadora y contar las colonias de microorganismos que aparecen como puntos azules con formación de gas (que se encuentren dentro del círculo) marcándolos con un esfero o marcador, solo el conteo de colonias azules con burbuja corresponde al recuento de *E. coli*. A continuación, se detalla los diferentes casos para la interpretación de estas placas:

Figura 4. Interpretación de resultados del recuento de *E. coli*



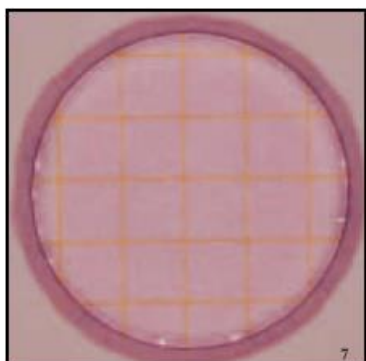
Recuento de *E. coli* = 0

Las burbujas de fondo son una característica del gel y no resultado del crecimiento de *E. coli*



Recuento de *E. coli* = 13

Al igual que las placas de Agar VRB, el intervalo óptimo de recuento (colonias totales) en las placas Petrifilm EC es 15 - 150.



Recuento real -10⁸

Altas concentraciones de *E. coli* causarán que el área de crecimiento se vuelva azul-púrpura.

Elaborado por: (Guanochanga, 2022)

El límite tolerable para *E. coli* es de <10 ufc/g (Norma Técnica INEN 1338,2016).

2.7.3. Metodología para el análisis de *Staphylococcus aureus*:

Para el recuento de *Staphylococcus aureus* en placas compact-dry mediante el método AOAC 2003.07 el proceso para el análisis de este microorganismo se detalla en *anexos*.

2.7.3.1. Interpretación de resultados:

Se retiraron las placas de la incubadora y se contó las colonias de microorganismos que aparecen en la cara posterior como colonias de color azul o azul claro y solamente estas se deben contar. Otras bacterias, además de *S. Aureus*, pueden crecer y formar colonias de color blanco y/o rojo purpura; sin embargo, solamente deben contarse las colonias de color azul o azul claro.

Figura 5. Recuento de colonias de *S. Aureus*



Elaborado por: (Guanochanga, 2022)

El límite tolerable para *Staphylococcus aureus* es de máx. 1×10^3 ufc/g (Norma Técnica INEN 1338,2016).

2.8. Análisis sensorial

Para el análisis sensorial se utilizó la escala hedónica, este tipo de escala analiza una serie de términos relacionados en el agrado o desagrado de un producto a través de las opiniones del consumidor. Las escalas van desde el mayor nivel de gusto hasta el de menor nivel de disgusto; este análisis fue aplicado a 12 catadores semientrenados pertenecientes al panel del departamento de desarrollo e innovación y departamento de calidad de la empresa Embutser, las características organolépticas a evaluar por parte de los panelistas fueron olor, color, sabor y textura, el modelo aplicado se observa en el *Anexo 9*.

Tabla 2. Valores de la escala hedónica

Valor	Muestra de grado de aceptabilidad
8	Me encanta
7	Me gusta mucho
6	Me gusta moderadamente
5	Me gusta poco
4	Ni me gusta, ni me disgusta
3	Me disgusta poco
2	Me disgusta moderadamente
1	Me disgusta mucho

Elaborado por: (Guanochanga, 2022)

2.9.Diseño experimental

Para el análisis de la incidencia de datos obtenidos en el presente trabajo de investigación se usó el diseño factorial AXB y la interacción entre sus factores, para el procesamiento de datos de los diferentes tratamientos el análisis estadístico de la presente investigación se usó el programa informático SPSS, los mismos que se detallan a continuación:

2.9.1. Cuadro de variables:

Tabla 3. Variables de estudio

Variable dependiente	Variable independiente	Indicadores	Medición
Salchicha Frankfurt	Método de conservación: - Ahumado (ahumado natural con madera de cedro) - Nisina (2 mg/Kg) - Clavo de olor (aceite esencial 0.5 ml por cada Kg de producto)	Análisis microbiológicos	Recuento de <i>Aerobios mesófilos</i> Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> Recuento de <i>E. coli</i>
	Tiempo de almacenamiento de la salchicha Frankfurt - 0 días - 10 días - 20 días	Características organolépticas (0 días)	Olor Sabor Color Aceptabilidad
		Análisis proximal del mejor tratamiento	Humedad Proteína Grasa Sal Cenizas

Elaborado por: (Guanochanga, 2022)

2.10. Modelo matemático:

A continuación, se describe el esquema del ANOVA para el diseño factorial

AXB:

Tabla 4. Modelo matemático ANOVA A x B

F de V	GL	SC
TOTAL	$(a \times b \times r) - 1$	$\sum (x_1^2 + \dots + x_n^2) - Fc$
TRATAM.	$(a \times b) - 1$	$\frac{\sum (X_{i1}^2 + \dots + X_{in}^2)}{\sum (A_1^2 + \dots + A_n^2)} - Fc$ $\frac{\sum (B_1^2 + \dots + B_n^2)}{r \times a} - Fc$
A	$a - 1$	
B	$b - 1$	
A x B	$(a - 1) \times (b - 1)$	SC TRAT - SC A - SC B
E. EXP.	Diferencia	SC TOT - SC TRAT

Elaborado por: (Guanochanga, 2022)

2.11. Esquema de campo:

Diseño factorial A (3 niveles) x B (3 niveles) = 9 tratamientos x 2 réplicas = 18 Unidades Experimentales.

Tabla 5. Esquema de campo

T1: a1b1 (ahumado + 0 días)	T4: a2b1 (nisina + 0 días)	T7: a3b1 (clavo de olor + 0 días)
T2: a1b2 (Ahumado + 10 días)	T5: a2b2 (nisina + 10 días)	T8: a3b2 (clavo de olor + 10 días)
T3: a1b3 (Ahumado + 20 días)	T6: a2b3 (nisina + 20 días)	T9: a3b3 (clavo de olor + 20 días)

Elaborado por: (Guanochanga, 2022)

2.12. Análisis estadístico:

Todos los resultados se analizaron utilizando el programa estadístico IBM SPSS Statistics versión 21.0, para el diseño AXB.

3. CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis proximal de la formulación de Salchicha Frankfurt

Tabla 6. Composición proximal de la salchicha Frankfurt

Análisis Físico Químico	Unidades	Resultados
Humedad	%	60.77
Proteína	%	13.53
Grasa	%	13.31
Sal	mg/100gr gr	809.38
Cenizas	%	3.09

Elaborado por: (Guanochanga, 2022)

3.1.1. Interpretación y discusión de la tabla 6

El contenido de humedad de las salchichas se encuentra estrechamente relacionado con el tipo de ingrediente cárnico utilizado para su elaboración, lo cual suele ser clasificado de acuerdo a su capacidad de retención de agua, es decir con su mayor o menor tendencia a perder agua durante el tratamiento térmico (Velasco, 2018). Probablemente estos valores en el contenido de humedad pueden deberse a que la materia prima cárnica de las salchichas se caracteriza por una disminución de la capacidad de retención de agua durante el almacenamiento. Según la Norma Técnica INEN 1338 (2016), tiene como límite máximo 65.00% de humedad para

salchichas tipo I, estando dentro del parámetro con 60.77% de humedad del producto evaluado.

De acuerdo a la formulación se estableció un análisis proximal de la salchicha Frankfurt, mediante el uso de la matriz de formulaciones (RE:ID:CO), donde se usa los datos históricos de análisis físico químicos realizados a la materia prima y a producto terminado mismos que fueron enviados a laboratorio externo para su cuantificación, en la *tabla 4* se muestra que el producto obtenido es de tipo I ya que su porcentaje de proteína es mayor a 13% denotando que la salchicha obtenida es premium, según la Norma Técnica INEN 1338 (2016), requisitos que rigen en el Ecuador para carne y productos cárnicos. Productos cárnicos crudos, productos cárnicos curados - madurados y productos cárnicos precocidos – cocidos, para salchichas tipo I es de 14% de proteína.

El contenido de grasa del producto es de 13.31%, García (2022) reporta valores obtenidos son más altos a los reportados para salchichas producidas con carne de res, carnero, pollo y cerdo, para las que se reportan valores en el contenido de grasa que oscilan entre un 24% y un 45%, por lo que la salchicha Frankfurt contiene menor porcentaje de grasa en comparación a este estudio.

Según Cinta (2020), las salchichas contienen de 600 a 1200 miligramos de sodio por cada 100 gramos, en la salchicha Frankfurt se tuvo 809.38 miligramos de sodio por cada 100 gramos estando dentro del rango evaluado por este autor. En comparación con la Norma Técnica INEN 1338 (2016) se encuentra dentro el parámetro establecido ya que su límite máximo es de 1200 miligramos de sodio por cada 100 gramos.

El contenido de cenizas obtenido es de 3.09% siendo esta mayor a el contenido de cenizas reportado por Velasco (2018) ya que obtiene 2.98% de cenizas en una salchicha correspondiente a los 15 días de almacenamiento. Estos datos corroboran la poca influencia del tiempo de almacenamiento en las condiciones de alteración de las salchichas empacadas al vacío y almacenadas bajo condiciones de refrigeración.

3.2.Resultados de los análisis microbiológicos:

Dentro de los parámetros de medición de vida útil, los microbiológicos tienen una gran importancia, tomando en cuenta que determinan la inocuidad del producto o la agrupación de condiciones y medidas necesarias durante la producción, almacenamiento, distribución y preparación de alimentos para asegurar que una vez ingeridos, no representen un riesgo para la salud del consumidor (Tafur 2019).

Se determinó el tiempo de estabilidad del producto de acuerdo a las siembras microbiológicas en ufc/gr a 0, 10 y 20 días, con el fin de determinar la carga bacteriana en el tiempo, se realizó un análisis microbiológico para *Aerobios mesófilos*, *E. coli* y *Staphylococcus Aureus*, concretamente a la salchicha Frankfurt + Ahumado, Salchicha Frankfurt + Nisina y Salchicha Frankfurt + Clavo de olor.

3.2.1. Análisis microbiológicos para Aerobios mesófilos.

Tabla 7. Anova del análisis microbiológico de los Aerobios Mesófilos 0 días

ANOVA					
AM0D					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2333333,333	2	1166666,667	3,500	,164
Dentro de grupos	1000000,000	3	333333,333		
Total	3333333,333	5			

Elaborado por: (Guanochanga, 2022)

Tabla 8. Prueba de Tukey del análisis microbiológico de los Aerobios Mesófilos 0 días

AM0D			
HSD Tukey ^a			
Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
T4	2	,0000	A
T7	2	500,0000	C
T1	2	1500,0000	B
Sig.		,155	

Elaborado por: (Guanochanga, 2022)

3.2.2. Interpretación y discusión de las tablas 6 y 7

Como se puede observar en las tablas 7 y 8, en los ensayos microbiológicos realizados para todos de los tratamientos, tratamiento T4 (Salchicha Frankfurt + Nisina), presentó una significancia menor al 0.05 siendo el mejor tratamiento puesto que a los 0 días evaluados no presenta crecimiento bacteriano, seguido del tratamiento T7 (Salchicha Frankfurt + clavo de olor) finalmente el tratamiento T1

(Salchicha Frankfurt + ahumado) mismas que si presentaron crecimiento bacteriano representados en ufc/gr muy bajos, lo que indica que el producto es viable para su conservación durante más tiempo. Según Aguilera en 2020, donde realiza el estudio de “Vida útil de salchicha vienesa almacenado en refrigeración, con la adición de un antimicrobiano natural”, menciona que la estabilidad microbiológica a los 0 días se debe a que se cuidó las condiciones de inocuidad durante el proceso de elaboración del producto, además que en el proceso de cocción permite bajar las cargas microbiológicas que pudieran estar presentes en el alimento por acción de la temperatura a la que se expone el alimento.

Tabla 9. Anova del análisis microbiológico de los Aerobios Mesófilos 10 días.

ANOVA					
AM10D					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	9336000,333	2	4668000,167	14004000,500	,000
Dentro de grupos	1,000	3	,333		
Total	9336001,333	5			

Elaborado por: (Guanochanga, 2022)

Tabla 10. Prueba de Tukey del análisis microbiológico de los Aerobios Mesófilos 10 días.

AM10D					
HSD Tukey^a					
Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	
T5	2	,0000			A
T8	2		1000,5000		B
T2	2			3000,5000	C
Sig.		1,000	1,000	1,000	

Elaborado por: (Guanochanga, 2022)

3.2.3. Interpretación y discusión de las tablas 9 y 10

En las tablas 8 y 9 se observa que una vez transcurridos 10 días el tratamiento T5 (Salchicha Frankfurt + nisina) no presenta crecimiento bacteriano en las placas analizadas, en la prueba de significancia se obtiene 0.00 lo que indica que este es el mejor tratamiento frente a los demás. Mahendra en 2017, menciona que el análisis microbiológico para mesófilos aerobios, representa una perspectiva global del contenido de microorganismos viables presentes en la salchicha de rescamarón, puede atribuirse a la presencia de nisina, la cual, según estudios previos demostró que *per se* o en combinación con otros antimicrobianos naturales presenta una barrera ser exitosa para la conservación de la salchicha que estudió este autor.

López (2018) reportó valores de mesófilos superiores (3 Log/g) a los 12 días de almacenamiento, en salchichas de calamar con nisina, probablemente relacionado con la proporción utilizada de nisina en la formulación, indicando que la nisina ejerce un efecto antimicrobiano capaz de conservar el alimento en este periodo de tiempo.

El tratamiento T8 compuesto por la Salchicha Frankfurt + clavo de olor, se puede afirmar que ejerce un efecto conservante en el producto, pues después de 10 días se obtuvo 1000 ufc/gr de aerobios mesófilos. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por (Charri & Huamán, 2017) en el que emplearon el aceite esencial de clavo de olor para el control de mesófilos aerobios inducido *in vitro*, a una concentración de 100% realizados en una difusión de agar por 24 h; el resultado presentó un efecto antimicrobiano de 40,61–0.32 + mm en su halo de inhibición,

igual que lo reportado por (Barrientos, 2017), con similitud de parámetros pero en diferente tiempo a las 72 h se observó un halo de 36.22–5,6 + mm.

En el tratamiento T2 compuesto por la Salchicha Frankfurt + ahumado, se obtuvo 3000 ufc/gr de aerobios mesófilos, siendo este el que menos acción conservante tuvo en comparación a los dos tratamientos, sin embargo, se encuentra dentro de los requisitos de la norma de referencia. Aguas en 2020 en su investigación obtuvo resultados que indicaron que los tratamientos tuvieron diferencias significativas, para aerobios mesófilos ya que el chorizo cuencano ahumado tuvo mayor carga microbiana que el chorizo cuencano con aceite esencial de clavo de olor.

Los tres tratamientos pueden ser evaluados por un lapso mayor de tiempo ya que según la calidad microbiológica evaluada el producto es apto para el consumo humano.

Tabla 11. Anova del análisis microbiológico de los Aerobios Mesófilos 20 días.

ANOVA					
AM20D					
	Suma de cuadrados	g l	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	30333333,333	2	15166666,667	45,500	,006
Dentro de grupos	1000000,000	3	333333,333		
Total	31333333,333	5			

Elaborado por: (Guanochanga, 2022)

Tabla 12. Prueba de Tukey del análisis microbiológico de los Aerobios Mesófilos 20 días.

AM20D					
HSD Tukey ^a					
Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	
T6	2	,0000			A
T9	2		2500,0000		B
T3	2			5500,0000	C
Sig.		1,000	1,000	1,000	

Elaborado por: (Guanochanga, 2022)

3.2.4. Interpretación y discusión de las tablas 11 y 12

Al seguir la tendencia del crecimiento bacteriano a los 0 y 10 días, los resultados obtenidos a los 20 días reflejan que en efecto la Salchicha + nisina (T6) es el mejor tratamiento para la conservación de este producto, pues se obtuvo 0 ufc/gr en las placas analizadas. Dominguez en 2020, al evaluar diferentes niveles de nisina (0,1, 0,2 y 0,3%) frente a un testigo, en carne molida para hamburguesa almacenada en refrigeración durante 15 días para evaluar el tiempo de vida útil del producto, tuvo como resultados que se evidenció el efecto antimicrobiano de la nisina ya que en los tratamientos con nisina se determinó ausencia de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, y menores cantidades de aerobios mesófilos, concordando con los resultados obtenidos en esta investigación.

En comparación con el *anexo 3* donde se tiene resultados microbiológicos del tratamiento testigo (formulación contiene nitratos y nitritos) enviado a laboratorio externo, para Aerobios mesófilos al cabo de 20 días se tiene 8.8×10^3 ufc/gr donde a diferencia del tratamiento T6 no se tuvo crecimiento de Aerobios

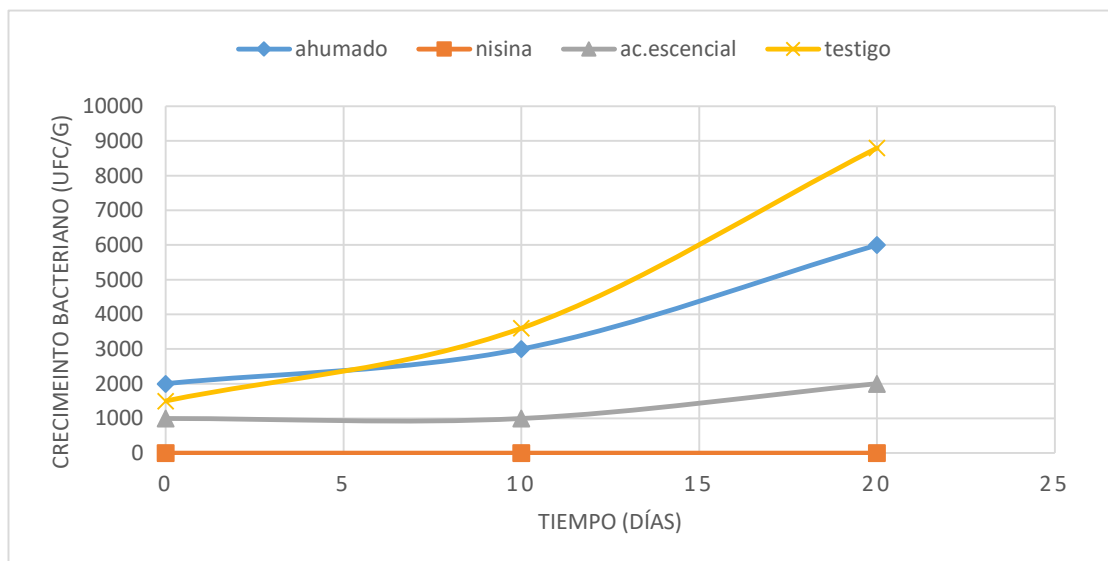
mesófilos, por lo que se concluye que la nisina si tiene un efecto bioconservador en el producto evaluado.

La Salchicha + clavo de olor (T9) y la Salchicha + ahumado (T3), ejercen un efecto antimicrobiano pues los resultados de 3000 ufc/gr y 5000 ufc/gr están por debajo de los parámetros de 5×10^5 ufc/gr la norma técnica de referencia. Por lo que se deduce que el producto es apto para el consumo humano.

3.2.5. Interacción de los tratamientos:

Para comprender la interacción de los tratamientos se establece la siguiente figura:

Figura 6. Interacción de los tratamientos



Elaborado por: (Guanochanga, 2022)

En la figura 6, se puede observar que si existe interacción entre los tratamientos, los tratamientos usados en la formulación de la salchicha Frankfurt ejercen un poder bioconservante, siendo el mejor tratamiento la nisina ya que se

visualiza que durante los 20 días análisis no presenta crecimiento bacteriano para *Aerobios mesófilos*, seguido del tratamiento donde se usó aceite esencial de clavo de olor en el mismo se obtuvo un crecimiento bacteriano para *Aerobios mesófilos* de 1000 ufc/gr a los 0 y 10 días, 2000 ufc/gr a los 20 días, este tratamiento se encuentra dentro de los parámetros de la norma de referencia, el tratamiento compuesto por el ahumado es el que menor poder bioconservante tuvo puesto que se obtuvo un crecimiento bacteriano para *Aerobios mesófilos* de 2000 ufc/gr a los 0 días, 3000 ufc/gr a los 10 días y 6000 ufc/gr a los 20 días de evaluación, sin embargo estos resultados se encuentran dentro de los parámetros que indica la norma de referencia para productos embutidos cocidos, por lo es seguro el consumo de este producto. Es evidente que los tratamientos presentan menor carga microbiana frente al tratamiento testigo pues este presenta 1500 ufc/gr a los 0 días, 3600 ufc/gr a los 10 días y 8800 ufc/gr a los 20 días, por lo que la aplicación de bioconservantes en la formulación de la salchicha Frankfurt resulta ser una alternativa para la sustitución de nitritos y nitratos.

Tabla 13. Resultados de análisis microbiológico de *E. coli* y *Staphylococcus Aureus*

NORMA DE REFERENCIA	TIEMPO DE ANÁLISIS	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO			
		<i>E. coli</i> ufc/g		<i>Staphylococcus Aureus</i> ufc/g	
		Resultado	Especificación	Resultado	Especificación
NTE INEN 1338:2016. Tabla 10.	0 días	0	<10	0	máx. 1×10^3
	10 días	0		0	
	20 días	0		0	
NTE INEN 1338:2016. Tabla 10.	0 días	0	<10	0	máx. 1×10^3
	10 días	0		0	
	20 días	0		0	
NTE INEN 1338:2016. Tabla 10.	0 días	0	<10	0	máx. 1×10^3
	10 días	0		0	
	20 días	0		0	

Elaborado por: (Guanochanga, 2022)

3.2.6. Interpretación y discusión de las tablas 13

Para los análisis microbiológicos de *E. coli* y *Staphylococcus Aureus* se obtuvo como resultado ausencia de estos microorganismos para 0, 10 y 20 días. Esto concuerda con Bravo (2018), donde determinó que en las salchichas de calamar-camarón donde incluyen nisina en su formulación estos cumplen con los requerimientos (NOM-122-SSA1-1994) para embutido tipo salchicha o productos afines de origen pesquero, presentando un comportamiento adecuado en lo que respecta a microorganismos patógenos (*E. coli.*, *Vibrio spp.* y *S. aureus*), indicadores de higiene como son los coliformes totales, coliformes fecales, y organismos deterioradores como mohos y levaduras.

(Pastrana & Durango, 2016), mencionan el efecto antimicrobiano de la canela sobre cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, que a una concentración del aceite de 150mg/ml, realizada en una difusión de agar a 24 h obtuvieron la CMI (Concentración Mínima Inhibidora) de 512 µg/mL y 2048 µg/mL respectivamente. (Montero & Revelo, 2017), realizaron diferentes concentraciones de 10, 30, 50, 70 y 90% de aceite esencial de canela en inhibición del crecimiento de la bacteria *Salmonella*, encontrando una ausencia total a partir del 50%, estos resultados tienen una semejanza con lo reportado por (Cunalata, 2018), que comparó el efecto antimicrobiano del aceite esencial de canela frente a cepas de *Salmonella* realizadas in vivo (pollos), obteniendo ausencia total a partir del 70% a las 9 semanas.

Cabe mencionar que la investigación realizada por Revelo (2019) fue in vitro y la de Cunalata fue in vivo, siendo uno de los principales factores para la

diferencia de concentraciones, encontrando in vitro ausencia con el 50% de aceite esencial de clavo de olor y en la in vivo al 70%. El aceite esencial de clavo de olor elimina el crecimiento bacteriano y fúngico sin presentar efectos secundarios. La actividad antimicrobiana del mismo depende mucho del tipo de materia prima, características genéticas de la planta, lugar y época de la producción, la maduración o edad de la planta, enfermedades de la planta; también tiende a factores como el clima, su pureza y por el método de extracción.

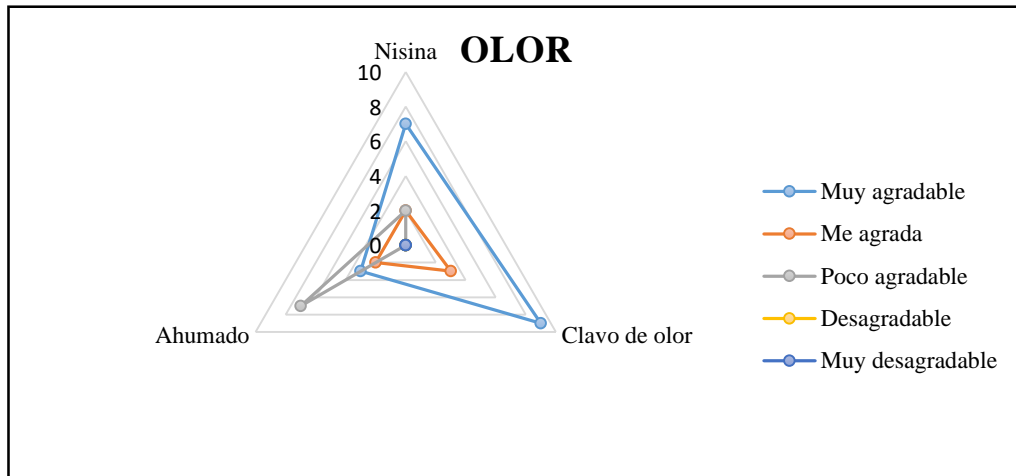
Briones & Velásquez en 2020 con aceite esencial de clavo de olor, cumple con todos los requisitos microbiológicos siendo apta para el consumo, ya que durante el proceso de elaboración se aplicaron todas las debidas técnicas desde la manipulación de alimentos, hasta la correcta limpieza y desinfección tanto del área de trabajo como los materiales, equipos y utensilios a utilizar durante el desarrollo del embutido.

Según los valores que muestra los resultados tabla 11 y 12 de los análisis microbiológicos para *E. coli* y *S. aureus* sí cumple en su totalidad con los requisitos que establecen las normas de referencia de este estudio.

3.3. Análisis sensorial

El análisis sensorial de la salchicha Frankfurt se realizó con la finalidad de evaluar las características organolépticas: olor, sabor, color y la aceptabilidad del producto, se valoró mediante una escala hedónica donde se observó la mejor combinación del producto y bioconservadores. Los resultados obtenidos serán reportados en los siguientes gráficos.

Figura 7. Resultados característica olor

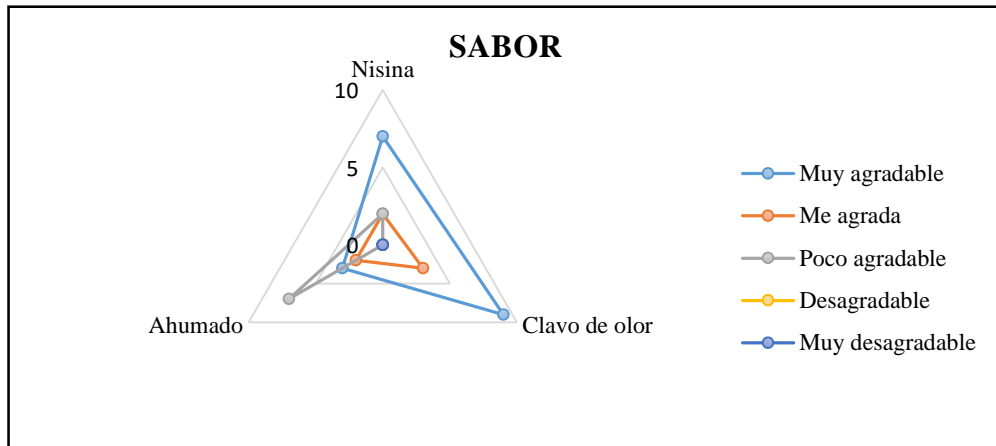


Elaborado por: (Guanochanga, 2022)

3.3.1. Análisis e interpretación de la figura 7

De acuerdo a la figura 7 se tiene que para la característica de olor el panel 12 de catadores el nivel que más puntuación obtuvo es de muy agradable y corresponde a la salchicha Frankfurt + clavo de olor. Suarez (2018), afirma que el aceite esencial de clavo de olor otorga al producto cárnico un aroma que agradable al olfato, sin embargo, hay que considerar la concentración a usar para lograr el equilibrio de aroma en el producto ya que el autor menciona que si se sobrepasa la concentración de aceite esencial el embutido pierde este atributo.

Figura 8. Resultados característica sabor



Elaborado por: (Guanochanga, 2022)

3.3.2. Análisis e interpretación de la figura 8

En la figura 8, una vez realizado el análisis sensorial para el panel de catadores les pareció mejor en sabor la salchicha Frankfurt + clavo de olor. Bravo en 2020 nos dice que el sabor va a depender de las sensaciones olfativas que posea el catador.

Siguiendo esta premisa el sabor del embutido más el aceite esencial es un conjunto de sensaciones olfativas que ayudan a los sentidos a activarse, en este caso el sentido del gusto causando el efecto de percepción de un mejor sabor.

Figura 9. Resultados característica color



Elaborado por: (Guanochanga, 2022)

3.3.3. Análisis e interpretación de la figura 9

En base a la figura 9 se procedió a evaluar la característica color, donde el panel de catadores manifiesta que la salchicha Frankfurt + clavo de olor presenta un color rosa, esto concuerda con la ficha técnica de la salchicha Frankfurt hot dog de FEDERER, donde se describe al producto para este atributo como una salchicha de pasta fina de color rosa.

Figura 10. Resultados de aceptabilidad



Elaborado por: (Guanochanga, 2022)

3.3.4. Análisis e interpretación de la figura 10

Para el análisis de la aceptabilidad como se muestra en la figura 9 el panel de catadores otorga el mayor puntaje al producto salchicha Frankfurt + clavo de olor donde consideran al nivel de me gusta mucho que encaja con la degustación por parte de los mismos pues se alcanza una puntuación de 6.75 por encima de los demás tratamientos.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- Se formuló una salchicha Frankfurt, incorporando bioconservadores nisina, aceite esencial de clavo de olor y ahumado, donde se demuestra que los mismos tienen efectos antimicrobianos y que pueden sustituir a los nitratos y nitritos cuya ingesta prolongada ocasiona daños a la salud de los consumidores.
- Se determina la composición proximal de la salchicha Frankfurt formulada, donde los parámetros evaluados de humedad, proteína, grasa, sal y ceniza se encuentra dentro de los parámetros descritos en la Norma Técnica INEN 1338:2016.
- Los datos reportados en el análisis microbiológico, luego de realizar el análisis estadístico, demuestran que la nisina presenta mayor poder bioconservador, seguido del aceite esencial del clavo de olor y por último el ahumado, poseen efectos antibacterianos para las principales bacterias como: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Aerobios mesófilos* que afectan a la carne y productos cárnicos, dichos resultados se encuentran dentro de los parámetros requeridos en la Norma Técnica INEN 1338:2016.
- De acuerdo al análisis sensorial se concluye que la combinación que tuvo mayor aceptación por parte del panel de catadores para las características de color, sabor, olor y aceptabilidad es la salchicha Frankfurt con aceite esencial de clavo de olor, obteniendo 5.9 puntos para el atributo color, 6.4 puntos para el atributo sabor, 6.2 puntos para el atributo olor y 6.7 puntos de aceptabilidad, superando al resto de bioconservadores.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar un estudio para la determinación de vida útil del producto usando diferentes métodos de conservación aplicando análisis microbiológicos que permitan evaluar la estabilidad del producto frente a estas variables.
- En base a los resultados obtenidos en la presente investigación se recomienda la formulación de los mejores tratamientos a nivel microbiológico y sensorial (salchicha Frankfurt + nisina y salchicha Frankfurt.....), con el fin de potenciar dichas características y formular un nuevo producto.
- Realizar un estudio de costos para la aplicación de nisina y clavo de olor en salchichas Frankfurt, con el fin de determinar su viabilidad técnica y económica para la producción del producto a nivel industrial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, A., & López, A. (2017). Extractos y aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y su potencial aplicación como agentes antimicrobianos en alimentos. *ResearchGate*, 7(2), 35-41.
- Aguilar, C. (2018). *Fundamentos Teóricos y Prácticas de Microbiología de Alimentos*. Obtenido de <http://www.investigacionyposgrado.uadec.mx/libros/2018/2018FundamentosdeMicrobiologiadeAlimentos.pdf>
- Alvis, A., Romero, P., Granados, C., Torrenegra, M., & Pajaro-Castro, N. (2017). Evaluación del color, las propiedades texturales y sensoriales de salchicha elaborada con carne de babilla (*Caiman Crocodilus Fuscus*). *Revista chilena de nutrición*, 44(1), 89-94.
- Amaya Arana, J. L. (2017). *Antimicrobianos Químicos en la Industria Alimentaria*.
- Baca, Y., Marcía, J., Chavez, V., Fernández, S., Montoya, H., Baca, J., ... & Ore, F. (2021). Determinación de Nitritos por Espectrofotometría UV visible en Productos Embutidos de tipo Jamón. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 5(2), 2299-2308.
- Bedale, W., Sindelar, J. J., & Milkowski, A. L. (2016). Dietary nitrate and nitrite: Benefits, risks, and evolving perceptions. *Meat science*, 120, 85-92.
- Calderón Altamirano, L. A. (2018). *Aprovechamiento integral de banana de rechazo en la elaboración de salchichas tipo Frankfurt* (Bachelor's thesis,

Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería en Alimentos.).

Chávez, R. A. M., & Rangel, J. J. V. (2019). Aditivos alimentarios: aspectos de regulación y seguridad. *Milenaria, Ciencia y arte*, (14), 15-16.

Castillo Castillo, O. (2020). Bacteriocinas y otros antimicrobianos encapsulados en matrices poliméricas con potencial uso en la industria alimentaria y farmacéutica (Doctoral dissertation, Universidad de Talca (Chile). Escuela de Tecnología Médica.).

Castro, G., Valbuena, E., Bríñez, W., Sánchez, E., Vera, H., & Tovar, A. (2009). Comparación del empleo de nisina y cultivos de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* para la biopreservación de queso blanco. *Revista Científica*, 19(2), 201-123.

Chenoll, E., Macián, M. C., Elizaquivel, P., & Aznar, R. (2007). Lactic acid bacteria associated with vacuum-packed cooked meat product spoilage: population analysis by rDNA-based methods. *Journal of Applied Microbiology*, 102(2), 498-508.

COLUGNA ESPINALES, Z. E. (2019). EFECTO DE LA NISINA EN LA VIDA UTIL DE YOGURT FRUTADO CON PROBIOTICOS.

Cortés-Sánchez, A. D. J., Díaz-Ramírez, M., & Salgado-Cruz, M. (2018). BIOCONSERVATION, FOOD AND FISH. *Agroproductividad*, 11(11).

- Dallouf, F. A., Pinheiro, P. F., Oliveira, C. H. O., Melo, D. B. D., Possebon, L., & Girol, A. P. (2020). Epidemiologia do câncer no sistema de saúde pública de Catanduva, São Paulo, Brasil. Conselho Científico, 15809, 28.
- Escalante Valverde, V. D. (2020). Evaluación de la capacidad conservante del aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) aplicado en la elaboración de yogurt tipo II (Bachelor's thesis).
- Gan, B., Gaynord, J., Rowe, S., Deingruber, T., & Spring, D. (2021). The multifaceted nature of antimicrobial peptides: current synthetic chemistry approaches and future directions. *Royal Society of Chemistry*, 50(1), 7820-7880.
- Griffiths, M. W., Schraft, H., Cliver, D. O., & Riemann, H. P. (2017). Foodborne diseases.
- Guevara Carrión, M. (2021). Desarrollo de una película biodegradable de alginato y fécula de malanga adicionada con nisina (Doctoral dissertation).
- Jacobsen, T., Budde, B. B., & Koch, A. G. (2003). Application of *Leuconostoc carnosum* for biopreservation of cooked meat products. *Journal of Applied Microbiology*, 95(2), 242-249.
- Juturu, V., & Wu, J. C. (2018). Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. *Biotechnology advances*, 36(8), 2187-2200.

- Kumariya, R., Garsa, A. K., Rajput, Y. S., Sood, S. K., Akhtar, N. y Patel, S. (2019). Bacteriocinas: Clasificación, síntesis, mecanismo de acción y desarrollo de resistencia en bacterias causantes del deterioro de los alimentos. *Patogénesis microbiana*, 128, 171-177.
- da Silva, J. P. L., de Souza, E. F., Della Modesta, R. C., Gomes, I. A., Freitas-Silva, O., & de Melo Franco, B. D. G. (2016). Antibacterial activity of nisin, oregano essential oil, EDTA, and their combination against *Salmonella* Enteritidis for application in mayonnaise. *Vigil Sanit Debate*, Rio de Janeiro, 4(1), 83-91.
- Londoño Pereira, M., & Gómez Ramírez, B. D. (2020). Nitratos y nitritos, la doble cara de la moneda.
- Magana-Arachchi, D. N., & Wanigatunge, R. P. (2020). Ubiquitous waterborne pathogens. In *Waterborne pathogens* (pp. 15-42). Butterworth-Heinemann.
- RAMOS, A. R. M. (2019). Evaluación de mezclas a partir de la endolisina PlyP100, nisina, arginato laurico y 8-polisina con efecto antimicrobiano sobre *Listeria monocytogenes* en queso panela.
- Jiménez Aguirre, K. E., & Salazar Yagual, L. Y. (2021). Plan de negocios para la elaboración y comercialización de crepas a base de harina de soya en el centro de la ciudad de Guayaquil (Bachelor's thesis, Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Administrativas).

- Matiacevich, S., & Sáez, C. (2018). Encapsulación de aceite esencial de lemongrass en el desarrollo de ingredientes naturales en polvo para preservación de alimentos: Una revisión.
- Meade, E., Slattery, M. A., & Garvey, M. (2020). Bacteriocins, potent antimicrobial peptides and the fight against multi drug resistant species: resistance is futile?. *Antibiotics*, 9(1), 32.
- Muñoz-Pabon, K., González-Callejas, C. A., & Villada-Castillo, H. (2022). Biocompuesto bicapa incorporado con nisina: caracterización y eficacia contra *Escherichia coli*. *Información tecnológica*, 33(1), 235-244.
- Guevara Carrión, M. (2021). Desarrollo de una película biodegradable de alginato y fécula de malanga adicionada con nisina (Doctoral dissertation).
- Jacobsen, T., Budde, B. B., & Koch, A. G. (2003). Application of *Leuconostoc carnosum* for biopreservation of cooked meat products. *Journal of Applied Microbiology*, 95(2), 242-249.
- Pino, A., y Aragüez, Y. (2021). Conocimientos actuales acerca de la encapsulación de aceites esenciales. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 52(1), 1-25.
- Pozo, D. (2021). *EVALUACIÓN DEL PROCESO DE ENLATADO SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES Y FISICOQUÍMICAS DE BABACO *Carica pentagona* H. EN ALMÍBAR*. UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE. <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/11897>

Pereira, M. L., & Gomez, B. (2020). Nitratos y nitritos, la doble cara de la moneda
Nitrates and nitrites, the two-sided coin Nitratos e nitritos, o lado duplo da moeda.
Revista de Nutrición Clínica y Metabolismo, 3(Colombia), 2–11.
<https://doi.org/10.35454/rncm.v4n1>

Rodríguez, D. A., Zambrano-Arauz, C. D., Zambrano-Arteaga, R. I., & Arteaga-Solórzano, R. A. (2021). CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DE UN EMBUTIDO AHUMADO A PARTIR DE DIFERENTES FORMULACIONES. UNESUM-Ciencias. *Revista Científica Multidisciplinaria*. ISSN 2602-8166, 5(3), 1-8.

Silva, J. P. L. da, Souza, E. F. de, Modesta, R. C. della, Gomes, I. A., Freitas-Silva, O., & Franco, B. D. G. de M. (2016). Antibacterial activity of nisin, oregano essential oil, EDTA, and their combination against *Salmonella Enteritidis* for application in mayonnaise. *Vigilância Sanitária Em Debate*, 4(1), 83.
<https://doi.org/10.3395/2317-269x.00308>

Pino, J. A., & Aragüez, Y. (2021). Conocimientos actuales acerca de la encapsulación de aceites esenciales. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 52(1), 10-25.

Pozo Ruiz, D. T. (2021). Evaluación del proceso de enlatado sobre las características funcionales y fisicoquímicas de babaco carica pentagona h. en almíbar (Bachelor's thesis).

Ramirez Heredia, R. C. (2022). Actividad antimicrobiana in vitro de la crema elaborada de la combinación del aceite esencial de *Syzygium aromaticum*

(CLAVO DE OLOR) y extracto etanolico de *Thymus vulgaris* L.(TOMILLO) frente a cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.

Rojas, C.-V. P. (2008). *Bacteriocinas: Sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria*.

Rathod, N. B., Phadke, G. G., Tabanelli, G., Mane, A., Ranveer, R. C., Pagarkar, A., & Ozogul, F. (2021). Recent advances in bio-preservatives impacts of lactic acid bacteria and their metabolites on aquatic food products. *Food Bioscience*, 44, 101440.

Rojas, C., & Vargas-Aguilar, P. (2008). Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria. *Revista Tecnología en Marcha*, 21(2), pág-17.

Padilla-Frausto, J. Jesús, Navarro-Villarruel, Claudia Luz, Robles-García, Miguel Ángel, Madriz-Elisondo, Ana Luisa , González-López, Andrea Yoselin, Olvera-Pimentel, Luz Estefanía , Ceja-Farias, Tania Karina, Determinación de hongos y sus aflatoxinas en huevos embrionados un lote de producción , *Journal of Microbiology & Health Education*: Vol. 3 No. 1 (2021)

Špehar, I. D., Ljoljić, D. B., Petanjek, Z., Zamberlin, Š., Kalit, M. T. y Samaržija, D. (2020). Actividad antimicrobiana de bacteriocinas de bacterias lácticas sobre *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium tyrobutyricum* en la producción de queso. *Mljekarstvo/Lechería*, 70(3).

Sánchez Reátegui, G. J. (2022). Efecto de la aplicación de recubrimiento comestible sobre las características microbiológicas y fisicoquímicas de pechugas de pollo envasadas al vacío refrigeradas. TAGI 832.

Sánchez-Martín, M. A., Salgado-Calvo, M. T., San-Miguel-Hernández, Á., Pachón-Julián, J., Rodríguez-Barbero, E., Pastor-Martín, M. R., & Cabrero-Lobato, P. (2019). Nisina (N 234), aditivo utilizado como conservante en alimentos. Gaceta Médica de Bilbao, 116(4), 166-173.

Soundharrajan, I., Park, H. S., Rengasamy, S., Sivanesan, R. y Choi, K. C. (2021). Aplicación y prospectiva futura de bacterias del ácido láctico como aditivos naturales para la producción de ensilaje: una revisión. Ciencias Aplicadas, 11(17), 8127.

Sánchez Reátegui, G. J. (2022). Efecto de la aplicación de recubrimiento comestible sobre las características microbiológicas y fisicoquímicas de pechugas de pollo envasadas al vacío refrigeradas. TAGI 832.

Sanchez, I. C., Vélez, J. R. C., & Arias, D. G. (2020). Bacteriocinas: visión básica y aplicada. Alimentos Ciencia e Ingeniería, 27(2), 7-33.

Sánchez-Martín, M. A., Salgado-Calvo, M. T., San-Miguel-Hernández, Á., Pachón-Julián, J., Rodríguez-Barbero, E., Pastor-Martín, M. R., & Cabrero-Lobato, P. (2019). Nisina (N 234), aditivo utilizado como conservante en alimentos. Gaceta Médica de Bilbao, 116(4), 166-173.

- Soltani, S., Hammami, R., Cotter, P. D., Rebuffat, S., Said, L. B., Gaudreau, H., ... y Fliss, I. (2021). Bacteriocinas como nueva generación de antimicrobianos: aspectos de toxicidad y regulaciones. *FEMS Microbiology Reviews*, 45(1), fuaa039.
- Soundharrajan, I., Park, H. S., Rengasamy, S., Sivanesan, R. y Choi, K. C. (2021). Aplicación y prospectiva futura de bacterias del ácido láctico como aditivos naturales para la producción de ensilaje: una revisión. *Ciencias Aplicadas*, 11(17), 8127.
- Zambrano Chávez, R. A. (2022). Sustitución de nitrito de sodio por extracto de espinaca (*spinacia oleracea*) y su influencia en la calidad de salchicha vienesa (Bachelor's thesis, Riobamba: Universidad Nacional de Chimborazo).
- Vallejo Andi, K. M. (2021). Utilidad de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas para la bioconservación de productos cárnicos.
- Vásquez, S. M., Suárez, H., & Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista chilena de nutrición*, 36(1), 64-71.
- Vicidomini, C., Roviello, V., & Roviello, G. N. (2021). Molecular basis of the therapeutical potential of clove (*Syzygium aromaticum* L.) and clues to its anti-COVID-19 utility. *Molecules*, 26(7), 1880.

- Yong, H. I., Kim, T. K., Choi, H. D., Jang, H. W., Jung, S., & Choi, Y. S. (2021). Clean label meat technology: Pre-converted nitrite as a natural curing. *Food Science of Animal Resources*, 41(2), 173.
- Zambrano Chávez, R. A. (2022). Sustitución de nitrito de sodio por extracto de espinaca (*spinacia oleracea*) y su influencia en la calidad de salchicha vienesa (Bachelor's thesis, Riobamba: Universidad Nacional de Chimborazo). Rojas, C., y Vargas, P. (2008). *Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria*. Mexico: Tecnología en Marcha.
- Zárate Sarapura, E. (2020). Modelamiento de la Bioconservación de la Hamburguesa de carne por productos orgánicos de bacterias Ácido Lácticas Homofermentativas.

ANEXOS

Proceso de elaboración de la salchicha Frankfurt:

En el *Anexo 1* se detalla el proceso de elaboración de la salchicha Frankfurt:

Anexo 1. Proceso de elaboración de la salchicha Frankfurt



Recepción de la materia prima cárnica (res y pollo)



Cortado, picado y molido (disco de 5 mm)



Cuteado



Embutido



Cocción



Enfriamiento

Fuente: (Guanochanga, 2022)

Anexo 2. Resultados fisicoquímicos salchicha Frankfurt testigo



INFORME DE ENSAYO NR. 225792

INFORMACION DE LA MUESTRA			
CODIGO LABORATORIO:	225792- 2	CONTENIDO ENCONTRADO:	209,7g (Muestra para análisis)
FECHA RECEPCION:	21/04/16	FECHA INICIO ENSAYO:	21/04/16
CONDICIONES AMBIENTALES DE LLEGADA DE LA MUESTRA:	Temperatura 4° C	MUESTREO: Es responsabilidad del cliente y, los resultados aplican a la muestra entregada por el cliente tal como se recibió	
TAMAÑO DE PORCION:	55g		
ENSAYOS FISICO QUIMICOS	METODO	UNIDAD	RESULTADO
Humedad	SEF-H (AOAC 950.46)	%	60,77
Proteína F= 6,25	SEF-PDU (AOAC 990.03)	%	13,53
Grasa	SEF-G (AOAC 991.36)	%	13,31
Acidos Grasos Saturados	SEIN-PL1 (AOAC 963.22)	%	4,72
Acidos Grasos Monoinsaturados	SEIN-PL1 (AOAC 963.22)	%	5,71
Acidos Grasos Poliinsaturados	SEIN-PL1 (AOAC 963.22)	%	2,88
Grasa trans	CG-M.I	%	0,00
Ceniza	SEF-C (AOAC 920.153)	%	3,09
Carbohidratos	CALCULO	%	9,30
Energía Total	CALCULO	kJ/100g	881
Sodio	SEIN-MIN (AOAC 999.11)	mg/100g	809,38
Colesterol	COLORIMÉTRICO	mg/100g	72,24
Azúcares totales	M. INTERNO	%	0,00

Datos tomados del cuaderno P-RG-01 pág. 304 / H-RG-02 pág. 348 / GE-RG-03 pág. 178 / C-RG-04 pág. 182 / AZ pág. 29 / PL RG-15 pág. 42 / MIN-RG-12 pág. 526 / COL pág. 8

Azúcares totales < 1.0%

INCERTIDUMBRE:			
PARÁMETRO FÍSICO QUÍMICO	INCERTIDUMBRE	PARÁMETRO FÍSICO QUÍMICO	INCERTIDUMBRE
HUMEDAD	±0,10% (Rangos menores al 5%) ±0,04% (Rangos mayores al 5%)	GRASA	±0,31% (Rangos menores al 1%) ±0,1% (Rangos menores al 10%) ±0,04% (Rangos mayores al 10%)
PROTEÍNA	±0,06%	CENIZA	±0,11% (Rangos ≤ al 1,5%) ±0,04% (Rangos mayores al 1,5%)

La incertidumbre expandida reportada está basada en una incertidumbre típica multiplicada por un factor de cobertura K=2, proporcionando un nivel de confianza de aproximadamente un 95%

Los resultados expresados arriba tienen validez solo para la muestra analizada en condiciones específicas no siendo extensivo a cualquier lote.

El laboratorio no se responsabiliza por la representabilidad de la muestra respecto a su origen y sitio del cual fue tomado

Este informe no será reproducido, excepto en su totalidad con la aprobación del Director Técnico

• **Tiempo de almacenamiento de informes:** Cinco años a partir de la fecha de ingreso de la muestra

Atentamente,

21/05/06
FECHA EMISION

Firmado digitalmente por: MAYRA YADIRA
VINUEZA MANOSALVAS Fecha y hora:
2021-05-06 15:41:06



Anexo 3. Resultados microbiológicos salchicha Frankfurt testigo

ANÁLISIS DE ESTABILIDAD REFRIGERACION				
CONDICIONES DE LA PRUEBA				
TEMPERATURA 4 °C +/- 2		HUMEDAD RELATIVA 30 % +/- 2		
			ANÁLISIS DE INICIO	ESTABILIDAD DE 45 DÍAS
FECHA			22/02/11	22/03/26
CODIGO DE LABORATORIO			245959-1	245959-4
ENSAYOS FÍSICO QUÍMICOS*	METODO	UNIDAD	RESULTADO	RESULTADO
Proteína F= 6,25	SEF-PDU (AOAC 990.03)	%	14,09	---
ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS	METODO	UNIDAD	RESULTADO	RESULTADO
Recuento total de aerobios	SEM-RT (INEN 1529 - 5)	UFC/g	<10	88 x 10 ¹
S. aureus	SEM-SA (AOAC 2003.08)	UFC/g	<10	<10
E. coli	SEM-CT (AOAC 991.14)	UFC/g	<10	<10
Salmonella 25g	SEM-SS (AOAC 967 (25.26.27) FDA/CFSAN BAM: CAPV)	---	AUSENCIA	AUSENCIA
ENSAYOS ORGANOLEPTICOS*	METODO	UNIDAD	RESULTADO	RESULTADO
Color	SENSORIAL	---	Rosado	Rosado
Olor	SENSORIAL	---	Característico	Característico
Sabor	SENSORIAL	---	Característico	Característico

* Los ensayos marcados con (*) NO están incluidos en el alcance de la acreditación del SAE y A2LA, con excepción de Proteína que está acreditada en A2LA.

Laboratorio de ensayo acreditado por el SAE con acreditación N° OAE LE 1C 05-001

* Las conclusiones que se indican a continuación están FUERA del alcance de acreditación del SAE y A2LA*

Conclusiones: Una vez realizado los ensayos al producto verificamos que mantiene sus características y por lo tanto su período de vida útil es de **45 DÍAS** a partir de la fecha de elaboración. Forma de conservación: **Refrigeración.**

Datos tomados de P-RG-01 pág. 375

Norma Técnica NTE INEN 1338:2016 para CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS. PRODUCTOS CÁRNICOS CRUDOS, PRODUCTOS CÁRNICOS CURADOS - MADURADOS Y PRODUCTOS CÁRNICOS PRECOCIDOS - COCIDOS. REQUISITOS.

El análisis microbiológico se realizó en base a la tabla 10. Requisitos microbiológicos para productos cárnicos cocidos, que se muestran a continuación:

Anexo 4. Requisitos microbiológicos para productos cárnicos cocidos.

REQUISITOS	n	c	m	M	METODO DE ENSAYO
Aerobios mesófilos,* ufc/g	5	1	5,0x10 ^b	1,0x10 ⁷	NTE INEN 1529-5
Escherichia coli ufc/g*	5	0	< 10	-	AOAC 991.14
Staphylococcus* aureus, ufc/g	5	1	1,0x10 ³	1,0x10 ⁴	NTE INEN 1529-14
Salmonella ¹ / 25 g**	10	0	Ausencia		NTE INEN 1529-15
¹ especies cero tipificadas como peligrosas para humanos * Requisitos para determinar término de vida útil ** Requisitos para determinar inocuidad del producto					

Fuente: (INEN 1338, 2016)

Procedimiento para análisis de Aerobios mesófilos (método AOAC 991.14)

Equipos y herramientas:

- Agua de peptona (0.1% m/v)
- Incubadora
- Balanza
- Puntas plásticas
- Pipeta automática
- Erlenmeyers o fiola
- Gradilla

- Tubos de vidrio
- Placas Petrifilm para recuento de Aerobios Mesófilos (AC)
- Mechero de Bunsen
- Frascos de vidrio
- Autoclave
- Encendedor
- Difusor plástico
- Marcador
- Tijera
- Agitador vórtex

Preparación de la muestra:

- Se limpió los mesones, la balanza, utensilios que fueron empleados con alcohol al 70% antes de iniciar el análisis.
- Se colocó la balanza junto al mechero Bunsen y encenderlo por 15 min antes de comenzar la inoculación. Los análisis fueron realizados en esta zona de protección.
- Se colocó las placas Petrifilm para recuento de Aerobios Mesófilos (AC) sobre una superficie plana y lisa.
- Se identificaron correctamente las placas con ayuda de marcadores permanentes en la lámina superior de la placa, de manera que no obstruyó posteriormente a la lectura de resultados.

- Los medios de cultivo fueron preparados según el “Instructivo para la Preparación y Almacenamiento de Placas y Medios de Cultivo” Petrifilm 3M.
- Se realizó una dilución 10^{-1} (por ejemplo, pesar 10 g de muestra en 90 ml de peptona, o su equivalente siempre manteniendo la relación 1:10) en un envase estéril. Se homogenizó la muestra dando 10 vueltas en sentido de las manecillas del reloj y 10 al contrario, por cuatro veces.
- Cuando se tuvo que realizar una dilución de 10^{-2} o más, se tomó 1 ml de la dilución 10^{-1} y se colocó en un tubo de ensayo con 9 ml de agua de peptona bufferada estéril 0.1%, después se homogenizó bien la muestra con ayuda del vórtex de agitación.

Inoculación e incubación de las muestras:

- Una vez conseguida la dilución requerida se levantó la lámina o cubierta superior y con la pipeta automática se dispensó 1ml de la muestra preparada, en el centro de la lámina y/o placa
- Se colocó el difusor plástico con el lado plano hacia arriba en el centro de la placa. Presionar cuidadosamente sobre el centro y distribuir de manera uniforme el inóculo en la placa Petrifilm sobre el área de crecimiento antes de que se forme el gel. No deslice el difusor a través de la lámina.
- Se dejó el dispensador en contacto con la placa durante 1 minuto y luego fue levantado con cuidado hacia arriba hasta que se gelatinice la placa.

- Finalmente, una vez que el medio se ha gelatinizado, se colocaron las placas horizontalmente con el área limpia hacia arriba y no más de 20 placas una sobre otra, en el interior de la incubadora. Se incubó a $35 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Se debe revisar las placas a las 24 horas para obtener resultados parciales pero los definitivos son a las 48 horas ± 3 horas
- Finalmente, se colocaron las placas en una funda plástica y se esterilizaron.

Procedimiento para el análisis de Escherichia. Coli (método AOAC 991.14)

Equipos y herramientas:

- Agua de peptona bufferada (c)
- Incubadora
- Puntas plásticas
- Pipeta automática
- Erlenmeyers
- Gradilla
- Tubos de vidrio
- Placas Petrifilm para recuento de E. coli y Coliformes (EC)
- Mechero de Bunsen
- Frascos de vidrio
- Cuchara plástica
- Tijera

- Pinza metálica
- Autoclave
- Fósforos
- Papel
- Difusor plástico

Preparación de la muestra:

- Se limpió los mesones, la balanza, el difusor y utensilios que fueron empleados, con alcohol al 70%.
- Se colocó la balanza junto al mechero Bunsen, que fue encendido por mínimo 15 minutos previo a comenzar los análisis. Los análisis fueron realizados en esta zona de protección.
- Se colocaron las placas Petrifilm para recuento de *E. coli* y Coliformes (EC) sobre una superficie plana y lisa.
- Se identificaron correctamente las placas a utilizarse con ayuda de marcadores permanentes en la lámina superior de la placa.
- Los medios de cultivo fueron preparados según el siguiente instructivo: “Instructivo para la Preparación y Almacenamiento de Placas y Medios de Cultivo” 3M.
- Se realizaron disoluciones

Inoculación e incubación de las muestras:

- Una vez conseguida la dilución requerida, se levantó la lámina o cubierta superior y con la pipeta automática colocada perpendicularmente, y se dispense 1ml de la muestra.
- Se dejó caer la lámina o cubierta superior sobre la muestra, suavemente para evitar que se formen burbujas o que la muestra se esparza hacia los extremos de la placa.
- Se colocó el difusor plástico con el lado plano hacia arriba en el centro de la placa. Se presionó de manera cuidadosa en el centro y se distribuyó uniformemente el inóculo en la placa Petrifilm sobre el área de crecimiento antes de que se forme el gel.
- *E. coli* se incubó durante 48 ± 4 horas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Se revisó las placas a las 24 horas para obtener resultados parciales pero los definitivos son a las 48 horas.
- Luego se colocaron las placas en una funda plástica y se esterilizaron.

Procedimiento para el análisis de Staphylococcus aureus (método AOAC 991.14):

Equipos y herramientas:

- Agua de peptona al 0.1%
- Erlenmeyers o fiolas
- Tubos de vidrio
- Gradilla

- Marcador
- Pipeta automática
- Puntas plásticas
- Mechero de Bunsen
- Fósforos
- Balanza
- Placas Petrifilm 3M para recuento de *Staphylococcus aureus*
- Discos 3M para confirmación de *Staphylococcus aureus*
- Difusor plástico
- Marcador

Preparación de la muestra:

- Se limpió los mesones, la balanza, el difusor y utensilios que fueron empleados, con alcohol al 70%.
- Se colocó la balanza junto al mechero Bunsen, que fue encendido por mínimo 15 minutos previo a comenzar los análisis. Los análisis fueron realizados en esta zona de protección.
- Se colocaron las placas Petrifilm para recuento de *S. aureus* sobre una superficie plana y lisa.
- Se identificaron correctamente las placas a utilizarse con ayuda de marcadores permanentes en la lámina superior de la placa.
- Los medios de cultivo fueron preparados según el siguiente instructivo: “Instructivo para la Preparación y Almacenamiento de Placas y Medios de Cultivo” 3M.

- Se realizaron disoluciones

Inoculación e incubación de las muestras:

- Una vez conseguida la dilución requerida, se levantó la lámina o cubierta superior y con la pipeta automática colocada perpendicularmente, y se dispuso dispensar 1ml de la muestra.
- Se dejó caer la lámina o cubierta superior sobre la muestra, suavemente para evitar que se formen burbujas o que la muestra se esparza hacia los extremos de la placa.
- Se colocó el difusor plástico con el lado plano hacia arriba en el centro de la placa. Se presionó de manera cuidadosa en el centro y se distribuyó uniformemente el inóculo en la placa Petrifilm sobre el área de crecimiento antes de que se forme el gel.
- *S. aureus* se incubó durante 24 ± 2 horas a 35 o $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Se revisó las placas a las 24 horas para obtener resultados parciales pero los definitivos son a las 48 horas.
- Luego se colocaron las placas en una funda plástica y se esterilizaron.

Interpretación de resultados:

Se retiraron las placas de la incubadora y se contó las colonias de microorganismos que aparecen en la cara posterior como colonias de color azul o azul claro y solamente estas se deben contar. Otras bacterias, además de *S. Aureus*, pueden crecer y formar colonias de color blanco y/o rojo purpura; sin embargo, solamente deben contarse las colonias de color azul o azul claro.

Resultados obtenidos de las siembras microbiológicas

En el Anexo 5 se adjunta se presentan los resultados obtenidos de las siembras microbiológicas para *Aerobios mesófilos*, *E. coli* y *S. Aureus*.

Anexo 5. Resultados siembras microbiológicas réplica 1

TRATAMIENTO	FECHA DE SIEMBRA	NORMA DE REFERENCIA	TIEMPO DE ANÁLISIS	pH	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO					
					Aerobios Mesofilos ufc/g		E. coli ufc/g		Staphylococcus Aureus ufc/g	
					Resultado	Especificación	Resultado	Especificación	Resultado	Especificación
Salchicha Frankfurt + Ahumado	28/11/2022	NTE INEN	0 días	6.36	1000	< 5x10 ⁵	0	<10	0	máx. 1x10 ³
	08/12/2022	1338:2016.	10 días	6.24	3000		0		0	
	18/12/2022	Tabla 10.	20 días	6.19	5000		0		0	
Salchicha Frankfurt + Nisina	28/11/2022	NTE INEN	0 días	6.26	0	< 5x10 ⁵	0	<10	0	máx. 1x10 ³
	08/12/2022	1338:2016.	10 días	6.18	0		0		0	
	18/12/2022	Tabla 10.	20 días	6.1	0		0		0	
Salchicha Frankfurt + Clavo de olor	28/11/2022	NTE INEN	0 días	6.38	0	< 5x10 ⁵	0	<10	0	máx. 1x10 ³
	08/12/2022	1338:2016.	10 días	6.22	1000		0		0	
	18/12/2022	Tabla 10.	20 días	6.18	3000		0		0	

Elaborado por: (Guanochanga, 2022)

Anexo 6 Resultados siembras microbiológicas réplica 2

TRATAMIENTO	FECHA DE SIEMBRA	NORMA DE REFERENCIA	TIEMPO DE ANÁLISIS	pH	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO					
					Aerobios Mesofilos		E. coli		Staphylococcus Aureus	
					Resultado	Especificación	Resultado	Especificación	Resultado	Especificación
Salchicha Frankfurt + Ahumado	28/11/2022	NTE INEN	0 días	6.36	2000	< 5x10 ⁵	0	<10	0	máx. 1x10 ³
	08/12/2022	1338:2016.	10 días	6.24	3000		0		0	
	18/12/2022	Tabla 10.	20 días	6.19	6000		0		0	
Salchicha Frankfurt + Nisina	28/11/2022	NTE INEN	0 días	6.26	0	< 5x10 ⁵	0	<10	0	máx. 1x10 ³
	08/12/2022	1338:2016.	10 días	6.18	0		0		0	
	18/12/2022	Tabla 10.	20 días	6.1	0		0		0	
Salchicha Frankfurt + Clavo de olor	28/11/2022	NTE INEN	0 días	6.38	1000	< 5x10 ⁵	0	<10	0	máx. 1x10 ³
	08/12/2022	1338:2016.	10 días	6.22	1000		0		0	
	18/12/2022	Tabla 10.	20 días	6.18	2000		0		0	

Elaborado por: (Guanochanga, 2022)

Resultados obtenidos del análisis sensorial

Tomando en cuenta las características "sabor, olor, color y textura", a continuación, se presenta 3 variantes del mismo producto, se solicita dar su opinión usando la siguiente condición: En la escala de 1 siendo este el producto que para usted "no le gustó nada" y 8 siendo el producto que para usted "le gusta mucho".

Anexo 7. Resultados análisis sensorial réplica 1

Panelistas	Producto 1 Salchicha Frankfurt + Ahumado	Producto 2 Salchicha Frankfurt + Nisina	Producto 3 Salchicha Frankfurt + Clavo de olor
1	4	6	8
2	6	3	5
3	3	5	6
4	5	4	7
5	7	5	8
6	6	5	7
7	6	7	5
8	4	5	7
9	5	7	8
10	5	4	6
11	3	5	7
12	5	4	7
Suma	59	60	81
Media	4.917	5.000	6.750

Elaborado por: (Guanochanga, 2022)

Anexo 8. Resultados análisis sensorial réplica 2

Panelistas	Producto 1 Salchicha Frankfurt + Ahumado	Producto 2 Salchicha Frankfurt + Nisina	Producto 3 Salchicha Frankfurt + Clavo de olor
1	3	7	8
2	5	2	7
3	3	6	6
4	6	5	8
5	6	4	7
6	5	5	6
7	7	7	4
8	4	4	5
9	4	5	8
10	5	4	6
11	4	5	6
12	6	3	8
Suma	58	57	79
Media	4.833	4.750	6.583

Elaborado por: (Guanochanga, 2022)

Anexo 9. Modelo prueba de catación



MODELO USADO PARA LA PRUEBA DE DEGUSTACIÓN

Tomando en cuenta la característica "sabor", a continuación se presenta 3 variantes del mismo producto, se solicita dar su opinión usando la siguiente condición: En la escala de 1 siendo el producto que para usted "no le gusta nada" y 8 siendo el producto que para usted "le gusta mucho".



Me
disgusta
mucho

1



Me gusta
mucho

8

Nombre	Producto 1	Producto 2	Producto 3

Elaborado por: (Guanochanga, 2022)