



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS PECUARIAS

TRABAJO DE TITULACIÓN

**Previa a la obtención del título de
INGENIERA EN INDUSTRIAS PECUARIAS**

**“ANTAGONISMO DE MICROORGANISMOS BENÉFICOS, FRENTE A
PATÓGENOS DE REFERENCIA EN UNA MEZCLA DE CUY Y HARINA DE
HABAS”**

AUTORA:

MARIA FERNANDA NAGUA SUAREZ.

RIOBAMBA – ECUADOR.

2016

El presente trabajo de titulación fue aprobado por el siguiente tribunal

Ing. M.C. Paúl Roberto Pino Falconí.
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. M.C. Manuel Euclides Zurita León.
DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ing. M.C. Cesar Iván Flores Mancheno.
ASESOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Riobamba, 18 de Agosto del 2016.

DEDICATORIA

A Dios, por cuidarme, protegerme, mantenerme siempre con esas ganas de seguir surgiendo en la vida, darme el valor para no dejarme caer cuando fallaba y más que todo por guiarme en el buen camino .

A mi papá que siempre, me apoyo me brindó su cariño, amor, confianza y los valores humanitarios para poder culminar esta etapa de mi vida.

A mi hermana Norma Nagua, que es como mi madre quien supo guiarme, brindarme apoyo en todo momento llenarme de cariño y fuerza para poder culminar de buena manera este episodio.

A mi cuñado Joffre Guevara, que es mi segundo padre gracias a su carácter, su cariño y confianza hacia mí es lo que me lleno de fuerza, coraje y valentía para no fallarle gracias por siempre estar ahí conmigo.

AGRADECIMIENTO

A Dios por darle a mi madre el valor de traerme al mundo, y brindarme la fuerza para seguir en el camino logrando mis metas, a pesar de los sufrimientos, pérdidas humanas, dándome las fuerzas para no dejarme caer y estancarme en la depresión.

A mi padre, hermana, cuñado y demás familiares que gracias a Dios siempre han estado a mi lado y tuvieron confianza en mí, me apoyaron tanto económicamente como también en el ámbito emocional, sin dejarme de lado en sus vidas y siempre llenando los vacíos sentimentales de la existencia.

A mis amigas las cuales incondicionalmente creyeron en mí y siempre estuvieron en los momentos que uno se necesita al estar lejos de la familia, me llenaron de momentos de muchas alegrías, algunas tristezas, diversión y desvelos durante la carrera, y lo más importante por esa amistad franca y sin intereses.

CONTENIDO

	Pág.
Resumen	v
Abstract	vi
Lista de Cuadros	vii
Lista de Gráficos	viii
Lista de Anexos	ix
I. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
II. <u>REVISIÓN DE LITERATURA</u>	3
A. El CUY	3
1. Antecedentes	3
2. Clasificación del tipo de cuy	4
a. Tipo I	4
b. Tipo II	4
c. Tipo III	4
d. Tipo IV	5
3. Valor nutritivo de la carne	5
4. Potencial económico de la producción de carne de cuy	6
B. HABAS	6
1. Origen	6
2. Composición nutricional de las habas	7
3. Cultivos y Disponibilidad en el Ecuador	8
C. CULTIVOS INICIADORES	8
1. Cultivos iniciadores para productos secos y curados	8
a. Cultivos iniciadores	9
2. Características generales de las bacterias ácido lácticas	10
a. Género de las bacterias ácido lácticas	11
1) <i>Lactococcus spp</i>	11

2) <i>Lactobacillus spp</i>	11
3) <i>Leuconostoc spp</i>	12
4) <i>Pediococcus spp</i>	12
5) <i>Streptococcus spp</i>	13
b. Características deseables de las bacterias ácido lácticas de acuerdo a los productos elaborados	13
D. MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN ALIMENTOS	14
1. <i>Escherichia coli</i>	14
2. <i>Salmonella</i>	16
a. Características microbiológicas	16
b. Patogenia	17
3. <i>Staphylococcus aureus</i>	18
a. Resistencia agentes físicos y químicos	19
b. Metabolismo	19
E. LA TECNOLOGÍA EN LOS ALIMENTOS FUNCIONALES	20
III. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	21
A. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	21
1. Condiciones meteorológicas	21
B. UNIDADES EXPERIMENTALES	21
C. MATERIALES, EQUIPOS E INSTALACIONES	22
1. Materiales	22
2. Equipos	22
3. Materia prima	23
4. Instalaciones	23
5. Formulaciones	23
D. TRATAMIENTO Y DISEÑO EXPERIMENTAL	25
E. MEDICIONES EXPERIMENTALES	26

1. Carga de Microorganismos	26
F. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA	27
G. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	27
H. METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN	27
IV. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	29
A. COMPORTAMIENTO DE MICROORGANISMOS BENÉFICOS	29
1. <i>Lactobacillus plantarum</i>	29
2. <i>Pediococcus pentosaceus</i>	31
3. <i>Lactobacillus + Pediococcus</i>	32
B. COMPORTAMIENTO DE MICROORGANISMOS PATOGENOS	34
1. <i>Escherichia coli</i>	34
2. <i>Salmonella spp</i>	36
3. <i>Staphylococcus aureus</i>	37
C. INTERACCIÓN ENTRE MICROORGANISMOS BENÉFICOS Y PERJUDICIALES	38
1. <i>Lactobacillus plantarum</i>	38
2. <i>Pediococcus pentosaceus</i>	39
V. <u>RECOMENDACIONES</u>	43
VI. <u>LITERATURA CITADA</u>	44

RESUMEN

En el Centro de Producción de Cárnicos y el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Pecuarias en la Espoch, se evaluó el efecto antagónico del *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus Pentosaceus* y la mezcla de los dos (*Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus Pentosaceus*) frente a patógenos de referencia (*Escherichia Coli.*, *Salmonella ssp.* y *Staphylococcus Aureus*) en una mezcla de cuy y harina de habas, para el desarrollo de la presente investigación se utilizó 4500 g, distribuidas bajo un diseño completamente al azar con un arreglo combinatorio. Determinándose que al utilizar *Lactobacillus plantarum* o la mezcla, no existe diferencias significativas ya que la salmonella se elimina a las 36 h, para el caso del *Staphylococcus aureus* se controló en su totalidad a las 72 h con los tres tratamientos, de igual manera para la *Escherichia coli* se inhibió en su totalidad a las 72 h al utilizar cualquier tratamiento, se recomienda utilizar *Lactobacillus plantarum* para un adecuado efecto antagónico ya que los resultados obtenidos demuestran que existe una mayor viabilidad económica con relación al tratamiento combinado, siendo este el mejor de los tratamientos utilizados.

ABSTRACT

In a center for Meat Production and the Food Microbiology Laboratory, in the Faculty of Animal Science, ESPOCH, the antagonistic effect of *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* and a combination of the two (*Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*) was evaluated against reference pathogens (*Escherichia coli.*, *Salmonella ssp.* and *Staphylococcus Aureus*) in a mixture of guinea pig meat and bean flour. For the purposes of this research, 4500 was used, distributed under a completely randomized design with a combinational arrangement. It was found that there was no significant difference using *Lactobacillus plantarum* or the combination, and that the *Salmonella* was eliminated at 36 hours, in the case of *Staphylococcus aureus* it was controlled completely at 72 hours with the three treatments, similarly *Escherichia coli* was inhibited in its entirety at 72 hours when using any of the treatments. Thus the use of *Lactobacillus plantarum* is recommended for the appropriate antagonistic effect as the results show that it has greater economic viability as compared to using the combination of microorganisms, the best of the treatments used.

LISTA DE CUADROS

No		Pág.
1	VALOR NUTRICIONAL (%) DE CARNE DE CUY FRENTE A OTRAS ESPECIES.	5
2	COMPOSICION DE LA CARNE DE CUY.	5
3	TIPOS DE CARNES SEGÚN LA FRECUENCIA DE CONSUMO.	6
4	COMPONENTES NUTRICIONALES DEL HABA.	7
5	CONDICIONES METEREOLÓGICAS.	21
6	FÓRMULA PARA LA MEZCLA DE CUY CON HARINA DE HABAS (7,5%).	23
7	FÓRMULA PARA LA MEZCLA DE CUY CON HARINA DE HABAS (7,5%).	24
8	FÓRMULA PARA LA MEZCLA DE CUY CON HARINA DE HABAS (7,5%).	24
9	ESQUEMA DEL EXPERIMENTO.	26
10	DESARROLLO DE MICROORGANISMOS BENÉFICOS EN LA MEZCLA DE CUY CON HARINA DE HABAS.	30
11	DESARROLLO DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN LA MEZCLA (CUY CON HARINA DE HABAS) FRENTE A CULTIVOS INICIADORES (horas).	35
12	DESARROLLO DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN LA MEZCLA DE CUY CON UN CULTIVO INICIADOR Y HARINA DE HABAS EN INTERACIÓN CON DIFERENTES TIEMPOS (horas).	36
13	ANTAGONISMO DE LOS LACTOBACILLUS FRENTE PATÓGENOS EN LA MEZCLA DE CUY CON HARINA DE HABAS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO (horas).	40
14	ANTAGONISMO DE LOS PEDIOCOCCUS FRENTE A PATÓGENOS EN LA MEZCLA DE CUY HARINA DE HABAS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO (horas).	41

15	ANTAGONISMO DE LOS LACTOBACILLUS + PEDIOCOCCUS FRENTE A PATÓGENOS EN LA MEZCLA DE CUY CON HARINA DE HABAS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO (horas).	44
----	--	----

LISTA DE GRÁFICOS

No.		Pág.
1	Crecimiento del <i>Lactobacillus plantarum</i> como cultivo iniciador en la mezcla de cuy con harina de habas en función del tiempo (horas).	31
2	Crecimiento del <i>Pediococcus pentosaceus</i> en la mezcla de cuy con harina de habas en función del tiempo (horas).	32
3	Crecimiento del <i>Lactobacillus</i> + <i>Pediococcus</i> en la mezcla de cuy con harina de habas en función del tiempo (horas).	33
4	<i>Escherichia coli</i> en función del tiempo (horas).	35
5	<i>Salmonella spp</i> en función del tiempo (horas)	38
6	<i>Staphylococcus aureus</i> en función del tiempo (horas).	39
7	Antagonismo de <i>Lactobacillus plantarum</i> frente a microorganismos de referencia (<i>Escherichia coli</i> , <i>salmonella ssp</i> , y <i>Staphylococcus aureus</i>) en la mezcla de cuy con harina de habas en función del tiempo (horas).	41
8	Antagonismo del <i>Pediococcus pentosaceus</i> frente a microorganismos de referencia (<i>Escherichia coli</i> , <i>salmonella ssp</i> , y <i>Staphylococcus aureus</i>) en la mezcla de cuy con harina de habas en función del tiempo (horas).	42
9	Antagonismo de <i>Lactobacillus plantarum</i> + <i>Pediococcus pentosaceus</i> frente a microorganismos perjudiciales (<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella spp</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>) en la mezcla de cuy con harina de habas en función del tiempo (horas).	44

LISTA DE ANEXOS

N°

1. Análisis de varianza *Escherichia coli* en la mezcla de cuy con harina de habas.
2. Análisis de varianza *Salmonella spp.* En la mezcla de cuy con harina de habas.
3. Análisis de varianza *Staphylococcus aureus* en la mezcla de cuy con harina de habas.
4. Análisis de varianza *Lactobacillus plantarum* antagonismo.
5. Análisis de varianza *Pediococcus pentosaceus* antagonismo.
6. Análisis de varianza *Lactobacillus+Pediococcus* antagonismo.
7. Antagonismo de los *Lactobacillus* frente patógenos En la mezcla de cuy con harina de habas en función del tiempo (horas).
8. Antagonismo de los *Pediococcus pentosaceus* frente a patógenos en la mezcla de cuy harina de habas en función del tiempo (horas).
9. Antagonismo de los *Lactobacillus + Pediococcus* frente a patógenos en la mezcla de cuy con harina de habas en función del tiempo (horas).

I. INTRODUCCIÓN

Los diferentes tipos de cuyes domésticos descienden de las especies silvestres que poblaron toda la América. En la actualidad su explotación se desarrolla en Perú, Bolivia, Colombia, y Ecuador, países que cuentan con diversos tipos. Los cuyes se clasifican atendiendo entre otros caracteres, al tamaño, color de los ojos, forma y coloración del pelaje y número de dedos. Se les identifica también con los nombres de las ciudades, regiones y países de origen, lo que da lugar a innumerables tipos Hernández, A., & Fernández, L. (2005).

El cuy es un roedor manso, empleado como mascota, animal de experimentación y productor de carne para el consumo humano. La piel se puede utilizar en la industria del curtido, la materia fecal mezclada con vegetales y con el orín, forma un excelente abono orgánico. Se recomienda que los cuyes para obtención de carne deben ser animales de temperamento tranquilo, con una conformación redondeada, cabeza corta con nariz y hocico redondos, cuerpo rectangular, pelo corto y liso, de color claro ya que las tonalidades claras dan un mejor aspecto a la canal Argote, E., Velasco, R., Paz, C., & Claves, P. (2007).

El haba Vicia Fava, es una leguminosa que fue traída a América por los conquistadores españoles a regiones con climas templados y fríos del continente. El haba es una fuente importante de proteína vegetal (26%) para las regiones templadas y frías, es un cultivo básico en la dieta alimenticia de la población rural. El haba se puede consumir en su estado tierno, verde en sopas como también en grano tostado pero esta presentación es más difícil de comercializarla. Otro estilo de consumir el haba es a través de molerla en un molino de granos después de tostarlas y fabricar harina para preparar pinol, muy rico en proteínas utilizada para alimentación animal especialmente monogástricos Aldana, L. (2010).

Los cultivos iniciadores se definen como microorganismos que se presentan en estado puro o mixto, seleccionados de acuerdo con sus propiedades específicas y que al agregarlo a los alimentos mejoran su aspecto, aroma, sabor y facilitan la tecnología. El uso de cultivos iniciadores para dirigir las fermentaciones industriales está ampliamente difundido. Esto ha traído como consecuencia que

durante los últimos años hayan aparecido en el mercado numerosos productos (bioconservadores, cultivos protectores, iniciadores, probióticos) que proponen formas de conservación alternativas a las tradicionales o proporcionan a los alimentos la cualidad de ejercer un efecto beneficioso para la salud paralelamente a su aporte nutritivo (Beldarraín, T. et al., 2008).

En la actualidad la actividad agroalimentaria ha incrementado en el país, y dentro de esto la innovación para elaborar productos pecuarios, con la presente investigación desarrollé una alternativa de producción, a su vez, para que no se pierdan las características propias de las materias primas, mantener un costo accesible y competitivo en el mercado. Una de las posibilidades para lograr este objetivo es la utilización de microorganismos benéficos. La utilización de bacterias inhibidoras de patógenos dará paso a nuevas investigaciones dentro de nuestro país en el campo de la industria de alimentos mediante los resultados obtenidos, se difundirá la información a nivel de pequeños y grandes productores y consumidores, los mismos que pueden ayudar de manera tecnológica a la realización de los nuevos productos libres de contaminación por patógenos.

Por lo señalado anteriormente se planteó los siguientes objetivos:

- Determinar la carga microbiana de los cultivos iniciadores (*Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*) y los patógenos de referencia (*Escherichia coli*, *Salmonella ssp*, y *Staphylococcus aureus*) en la mezcla de cuy y harina de habas.
- Evaluar el efecto antagónico del *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* y la mezcla de los dos (*Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*) frente a patógenos de referencia (*Escherichia coli*, *Salmonella ssp*. y *Staphylococcus aureus*) en una mezcla de cuy y harina de habas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

A. EI CUY

1. Antecedentes

Zully, R., & Herrera, E. (2012), menciona que el cuy (cobayo o curí) es un mamífero roedor originario de la zona andina de Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú. El cuy constituye un producto alimenticio de alto valor nutricional que contribuye a la seguridad alimentaria de la población rural de escasos recursos. Los cuyes criollos constituyen la población predominante. Los animales se caracterizan por ser pequeños, rústicos, poco exigentes en calidad del alimento; se desarrollan bien bajo condiciones adversas de clima y alimentación. Criado técnicamente mejora su productividad; la separación por clases mediante el sistema de pozas permite triplicar su producción, logrando un mayor número de crías.

Zully, R., & Herrera, E. (2012), manifiesta que por su capacidad de adaptación a diversas condiciones climáticas, los cuyes pueden encontrarse desde la costa o el llano hasta alturas de 4500 metros sobre el nivel del mar y en zonas tanto frías como cálidas. Las ventajas de la crianza de cuyes incluyen su calidad de especie herbívora, su ciclo reproductivo corto, la facilidad de adaptación a diferentes ecosistemas y su alimentación versátil que utiliza insumos no competitivos con la alimentación de otros monogástricos.

Las investigaciones realizadas en el Perú han servido de marco de referencia para considerar a esta especie como productora de carne. El esfuerzo conjunto de los países andinos está contribuyendo al desarrollo de la crianza de cuyes en beneficio de sus pobladores (Zully, R & Herrera, E. 2012).

2. Clasificación del tipo de cuy

Zully, R., & Herrera, E. (2012), manifiesta la clasificación de cuyes por tipo se hace por características fenotípicas del pelo, considerando la longitud y la dirección del pelo, en todo los casos se no asocian con cualquier característica productiva.

a. Tipo I

Pelo corto, lacio y pegado al cuerpo, es el más difundido y caracteriza al cuy peruano productor de carne. Puede o no tener remolino en la frente. Se encuentran de colores simples claros, oscuros o combinados. Tiene un cuerpo compacto y anguloso, tiene el mejor comportamiento como productor de carne. La denominación en el Perú es LACIO (Zully, R & Herrera, E. 2012).

b. Tipo II

Pelo corto y pegado, en forma de rosetas o remolinos a lo largo del cuerpo, es menos precoz. Está presente en poblaciones de cuyes criollos, existen de diversos colores. No es una población dominante, por lo general en cruzamiento con otros tipos se pierde fácilmente. Tiene buen comportamiento como productor de carne. La denominación es ROSETADO (Zully, R & Herrera, E. 2012).

c. Tipo III

Tiene pelo largo y lacio, presenta dos subtipos, los cuyes del subtipo 3-1 presentan el pelo largo, lacio y pegado al cuerpo, pudiendo presentar un remolino en la frente. El subtipo 3-2 comprende a aquellos animales que presentan el pelo largo, lacio en la parte posterior. Está poco difundido pero bastante solicitado por la belleza de muestra. No es buen productor de carne, si bien utilizado como mascota. Su denominación es IANOSO ó IANDOSO (Zully, R & Herrera, E. 2012).

d. Tipo IV

Es de pelo ensortijado, característica que presenta sobre todo al nacimiento, ya que se va perdiendo a medida que el animal se desarrolla, tornándose en erizado. Este cambio es más prematuro cuando la humedad relativa es alta. Su forma de cabeza y cuerpo es redondeado, de tamaño medio. Tiene una buena implantación muscular y con grasa de infiltración, el sabor de su carne destaca a este tipo. La variabilidad de sus parámetros productivos y reproductivos le da un potencial como reproductor de carne. Su denominación es CRESPO (Zully, R & Herrera, E. 2012).

3. Valor nutritivo de la carne

Escaes, C. (2010), menciona que como alimento, la carne de cuy es una valiosa fuente de proteínas muy superior a otros productos de origen animal, como se puede observar en el (cuadro 1).

Cuadro 1. VALOR NUTRICIONAL (%) DE CARNE DE CUY FRENTE A OTRAS ESPECIES.

Especie	Humedad	Proteína	Grasa	Minerales
Cuy	70,60	20,30	7,83	0,80
Conejo	69,30	20,27	3,33	1,42
Pollo	70,20	18,30	9,30	1,00
Vacuno	58,00	17,50	21,80	1,00
Ovino	50,60	16,40	31,10	1,00
Porcino	46,80	14,50	37,30	0,70

Fuente: Escaes, C. (2010).

En el cuadro 2, se manifiesta la composición de la carne de cuy, tomando en cuenta las variables, humedad, proteína y grasa.

Cuadro 2. COMPOSICIÓN DE LA CARNE DE CUY.

Variable	Indicador (%)
Humedad	72,67
Proteína	19,21
Grasa	7,43

Fuente: Chávez, S. (2013).

El cuadro 3, muestra los tipos de carne según la frecuencia de consumo de las personas en Ecuador.

Cuadro 3. TIPOS DE CARNES SEGÚN LA FRECUENCIA DE CONSUMO.

Carnes habituales	Carnes especiales
Pollo, res, pescado y cerdo	Ovino, caprino, cuy, conejo, pato y pavo

Fuente: Chávez, S. (2013).

4. Potencial económico de la producción de carne de cuy

Chávez, S. (2013), menciona que de acuerdo con información del Instituto Nacional de Innovación Agraria, INIA, citada por el Ministerio de Agricultura y Riego¹², la oferta de carne de cuy a nivel nacional, hacia 2003, se estimaba en 16 500 toneladas métricas anuales. La mayor parte de esta producción todavía se realizaba a nivel familiar para el autoconsumo, de forma empírica o tradicional, con la participación de varones y mujeres de diversas edades, pero destacándose el liderazgo de la mujer. Esta actividad era complementaria a otras actividades económicas de las familias y estaba orientada al autoconsumo, la seguridad alimentaria y la nutrición. En otros casos, el excedente de la producción era destinada al mercado principalmente local.

B. HABAS

1. Origen

El haba *Vicia faba* L. es de origen asiático. Afganistán y Etiopía se consideran como los principales centros de origen, aunque algunos autores mencionan que posiblemente el haba es de origen africano, cultivándose desde hace unos cuatro

mil años. El cultivo de haba fue introducido a América y Guatemala por los conquistadores españoles y se ha desarrollado únicamente en pocos países de América que poseen altiplano con zonas frías como México, República Dominicana, Brasil, Perú, Paraguay, Colombia, y Bolivia (Aldana, L. 2010).

Aldana, L. (2010), menciona que en el altiplano guatemalteco, es bien generalizada la siembra de haba de diferentes variedades. Muchas de ellas, de diferentes colores (blanco, amarillo y morado). El haba blanca grande (salpor) es la más apreciada, sin embargo, el haba amarilla y morada se observan en los campos de los agricultores y en los mercados locales. La única haba que se comercializa en Guatemala como semilla certificada, es ICTA Blanquita.

2. Composición nutricional de las habas

Los componentes nutricionales del haba en promedio están compuestos de un 24 a 31 % de proteína, (cuadro 4)

Cuadro 4. COMPONENTES NUTRICIONALES DEL HABA.

Nutrientes	Unidad	Cantidad/100g
Humedad	G	62,4
Calorías	Kcal	144
Carbohidratos	G	24,7
Proteínas	G	11,31
Grasa	G	0,5
Cenizas	G	1,1
Calcio	Mg	32
Hierro	Mg	2,7
Fósforo	Mg	194
Caroteno	Mg	0,26
Tiamina B1	Mg	0,35
Riboflavina B2	Mg	0,22
Niacina B3	Mg	1,93
Vitamina C	Mg	31

Fuente: Macías, J., & Vincés, R. (2011).

3. Cultivos y Disponibilidad en el Ecuador

Macías, J., & Vincés, R. (2011), manifiesta que la disponibilidad de producción de habas en el Ecuador, se encuentra localizada en tres zonas, a lo largo del callejón interandino, las que se cultivan de acuerdo a las preferencias del mercado y a la costumbre de sus usos. La zona Norte: Carchi e Imbabura, La zona Central: Pichincha, Cotopaxi y Tungurahua, La zona Sur: Bolívar, Chimborazo, Cañar, Azuay y Loja.

En los últimos años, este cultivo ha sufrido un descenso de su superficie cultivada, debido fundamentalmente a la ausencia de variedades mejoradas adaptadas a la mecanización del cultivo y a los ataques de sus plagas. Cabe mencionar, que las siembras se realizan durante todo el año, si se dispone de riego. Pero es costumbre muy buena esperar el fin del verano o principios de las lluvias. En la serranía se siembra de Febrero a Octubre. Según el III Censo Agropecuario, en el Ecuador se cosechan aproximadamente 5000 hectáreas sembradas de habas (Macías, J., & Vincés, R. 2011).

C. CULTIVOS INICIADORES

1. Cultivos iniciadores para productos secos y curados

Olivera, J. (2011), manifiesta que La utilización de cultivos iniciadores para productos secos y curados es un concepto comercial relativamente nuevo en comparación con los cultivos lácticos. El primer cultivo cárnico iniciador en Europa fue un cultivo de Micrococcaceae puro utilizado para el desarrollo de sabor y color, comenzó a ser comercializado en 1961 por la compañía alemana Rudolph Müller. Unos años después, los cultivos cárnicos iniciadores se desarrollaron con cultivos mixtos, compuestos por bacterias ácido-lácticas y Staphylococcus. En 1991 Rudolph Muller se convirtió en parte del Hansen Group, quien en 1980 inició la comercialización de cultivos cárnicos bajo el nombre “FloraCarn” reemplazado en el año 1998 por la marca “Bactoferm”. Hansen es actualmente uno de los líderes mundiales en investigación, desarrollo y producción de cultivos cárnicos iniciadores.

Durante los últimos años, el desarrollo de cultivos de fermentación rápida se ha convertido en uno de los principales focos de atención de trabajo debido a una fuerte demanda del mercado. Los cultivos de fermentación rápida ofrecen una rápida acidificación, la cual asegura una reducción en el tiempo de procesamiento. Esto se traduce en un ahorro en los costos para el industrial del sector cárnico (Olivera, J. 2011).

a. Cultivos iniciadores

Olivera, J. (2011), manifiesta que la capacidad acidificante de las BAL es una propiedad de interés tecnológico para la industria alimentaria, de hecho se utiliza el concepto de cultivos “starters” o iniciadores en referencia a cultivos puros o mezclas de bacterias ácido lácticas que se emplean en la elaboración de productos fermentados por su gran actividad acidificante. El cultivo “starter” siempre presenta una especie homoláctica y cuando se requieren componentes de aroma y gusto incluye una heteroláctica como *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. Los cultivos iniciadores que se suelen emplear están constituidos mayoritariamente por especies de los géneros: *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*.

Se suele clasificar a los cultivos iniciadores de acuerdo a la temperatura óptima de crecimiento de las bacterias ácido lácticas que los constituyen, existiendo tres tipos: mesófilos, termófilos y mixtos. Los cultivos mesófilos son empleados en procesos fermentativos cuyas temperaturas óptimas se ubican entre 20-30°C, mientras que los cultivos termófilos son utilizados cuando el rango de temperatura se encuentra entre 30-50°C (Olivera, J. 2011).

En cuanto a los cultivos mixtos, se los emplea en procesos fermentativos que ocurren entre 30-40°C. A su vez, los cultivos iniciadores pueden ser: puros (compuestos por una única cepa), mixtos (es decir, una mezcla de cepas de bacterias ácido lácticas definidas) o artesanales (mezcla indefinida de bacterias ácido lácticas nativas de la leche). La comercialización de los fermentos puede ser como: liofilizados, deshidratados, congelados o líquidos (Olivera, J. 2011).

2. Características generales de las bacterias ácido lácticas

Olivera, J. (2011), menciona que las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de bacterias Gram-positivas, no esporuladas, no pigmentadas, catalasa negativas, mayoritariamente nitrato reductoras negativas y capaces de crecer en el rango de pH entre 4,0 y 4,5; anaerobias facultativas o microaerofílicas, cuyo metabolismo es fermentador y que dependiendo si da como único producto de fermentación ácido láctico o está acompañado por la generación de otros compuestos se distinguen en bacterias homolácticas o heterolácticas, respectivamente.

Las bacterias lácticas homofermentativas generan como producto principal de la fermentación ácido láctico, estos microorganismos son todos los miembros del género *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y varias especies de *Lactobacillus*. Con respecto a las bacterias heterolácticas, durante la fermentación además de ácido láctico producen dióxido de carbono, ácido acético, ácido fórmico y etanol (Olivera, J. 2011).

Este tipo de fermentación ocurre en bacterias del género *Leuconostoc* y *Lactobacillus*. Las bacterias ácido lácticas son microorganismos auxótrofos, es decir, requieren una serie de componentes (aminoácidos, péptidos, purinas, pirimidinas y vitaminas tales como la vitamina B, el ácido pantoténico, la biotina y el ácido fólico) que no pueden ser sintetizados por ellos mismos, debido a lo cual deben encontrarse en el medio de crecimiento (Olivera, J. 2011).

El elevado requerimiento nutritivo (mayor al de los seres humanos) y la cantidad de energía que pueden obtener por fermentación, condicionan los hábitats naturales que son propicios para el desarrollo de estas bacterias, siendo los mismos: la leche y los productos derivados de la misma, el intestino y las mucosas de humanos y animales así como también plantas intactas y en descomposición (Olivera, J. 2011).

Con respecto a las temperaturas en que se desarrollan estos microorganismos, los hay: mesófilos, que crecen entre 25-30°C y termófilos, cuyo rango de temperatura se encuentra entre 40-44°C (Olivera, J. 2011).

Desde el punto de vista filogenético se han definido doce géneros de bacterias lácticas y estos son: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium*, *Alloicoccus* y *Weissella*. Dichos géneros se ubican taxonómicamente dentro del phylum Firmicutes, en la clase Bacilli, orden Lactobacillales (Olivera, J. 2011).

a. Género de las bacterias ácido lácticas

1) Lactococcus spp

Olivera, J. (2011), menciona que el género *Lactococcus* pertenece a la Familia Streptococcaceae y está integrado por seis especies. Desde el punto de vista morfológico estas bacterias son cocos esféricos u ovoides cuyo diámetro oscila entre 0,5 y 1 µm y se los suelen encontrar de a pares, formando cadenas cortas o en forma simple.

Los *Lactococcus* son microorganismos mesófilos, no móviles capaces de crecer a 10°C pero no a 45°C, están descriptos como BAL homo-fermentativas, aunque existen miembros de este género que son hetero-fermentativos, en la fermentación generan L-ácido láctico. El rango de pH óptimo para el crecimiento de este género es entre 6,0 y 6,5; algunas especies son capaces de crecer a pH 4,4 pero ninguna a pH 9,6 (Olivera, J. 2011).

2) Lactobacillus spp

Este género pertenece a la Familia Lactobacillaceae y en la actualidad está constituido por 116 especies, algunas de las especies actuales son anaerobias estrictas. Morfológicamente estas bacterias Gram-positivas presentan forma de bastón cuyo tamaño varía entre: 0,5 a 1,2 µm por 1,0 a 10,0 µm; pero también

pueden encontrarse como cocobacilos, bastones curvados o coriniformes, se suelen disponer en cadenas y de manera simple (Olivera, J. 2011).

Existen algunas especies que son móviles gracias a la presencia de flagelos peritricos, otra excepción es que ciertos miembros de este género pueden ser nitrato reductores. Con respecto a la temperatura óptima de crecimiento los *Lactobacillus* pueden ser mesófilos o termófilos. Existe variación a nivel de especie con respecto a la capacidad de crecer a 10 y 45 °C (Olivera, J. 2011).

En cuanto a la fermentación, pueden generar L-ácido láctico, D-ácido láctico o una mezcla de ambos isómeros, y se los distinguen en tres categorías: homo-fermentativos estrictos, hetero-fermentativos estrictos y hetero-fermentativos facultativos. En referencia al pH óptimo de crecimiento este oscila entre 4,5 y 6,2. Algunas especies pueden crecer a pH 3,2 y otras a pH 9,6 (Olivera, J. 2011).

3) Leuconostoc spp

Taxonómicamente este género pertenece a la Familia Leuconostocaceae y está constituido por once especies. Se trata de cocos Gram-positivos, no móviles, de forma esférica o lenticular que se disponen de a pares y constituyendo cadenas cortas, también pueden disponerse solos. De las BAL aisladas de los alimentos representan un grupo minoritario a causa de su lento crecimiento y baja capacidad acidificante (Olivera, J. 2011).

Estos microorganismos no hidrolizan arginina. Con respecto a la temperatura óptima de crecimiento son mesófilos y presentan crecimiento a 8°C pero no 45°C. En cuanto al pH, requieren que sea mayor a 4,5, hay algunas especies que pueden crecer a pH superior a 9,5. Desde el punto de vista de la fermentación son heterofermentativos y producen D-ácido láctico (Olivera, J. 2011).

4) Pediococcus spp

El género *Pediococcus* forma parte de la Familia Lactobacillaceae y presenta once especies. Estas bacterias Gram -positivas son cocos esféricos, jamás

ovoides o elongados, tienen 0,5 a 0,8 μm de diámetro y no son móviles, se disponen de a pares, pero también en tétradas debido a que se dividen en dos planos. *Pediococcus* spp. está constituido por especies homo-fermentativas estrictas y hetero-fermentativas facultativas, que generan L-ácido láctico o L-ácido láctico y D-ácido láctico como producto de la fermentación (Olivera, J. 2011).

Pueden crecer a pH 5,0, pero no a pH 9,0. Son microorganismos mesófilos, la mayoría de las especies pueden crecer a 35°C; a 10 y 45°C la capacidad de crecimiento varía según la especie (Olivera, J. 2011).

5) Streptococcus spp

Este género se halla dentro de la Familia Streptococcaceae y está integrado por 67 especies, algunas de ellas patógenas, a diferencia de éstas la especie *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* se considera GRAS, sigla que en inglés significa generalmente reconocido como seguro, ya que ha perdido o se han inactivado los genes característicos de las especies patógenas (Olivera, J. 2011).

Morfológicamente se trata de cocos Gram-positivos ovoides que se disponen de a pares o en cadenas. Con respecto a la fermentación, son homofermentativos y generan L-ácido láctico. Son microorganismos no móviles, mesófilos incapaces de crecer a 10°C; algunas especies crecen a 45°C, en el caso de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* el crecimiento continúa hasta los 50°C. El pH óptimo para el crecimiento es de 6,5 y no pueden desarrollarse a pH 4,4 ni 9,6. Algunas especies son capaces de hidrolizar la arginina y otras no (Olivera, J. 2011).

b. Características deseables de las bacterias ácido lácticas de acuerdo a los productos elaborados

La selección de bacterias ácido lácticas para formular cultivos iniciadores se hace en base a que éstas presenten ciertas propiedades: una capacidad de acidificación que no sea lenta, correcta producción de aroma y sabor, habilidad

para obtener la textura adecuada , ausencia de patogenicidad , fácil preservación y propagación y que sea capaz de prevalecer sobre la micro flora competitiva, pues se busca obtener un cultivo iniciador cuya tasa de viabilidad sea adecuada ,que esté libre de contaminación y sea altamente activo en las condiciones de producción (Olivera, J. 2011).

D. MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN ALIMENTOS

1. Escherichia coli

Andrade, M. (2010), menciona que E. coli es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas, y no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole.

Forma parte de la familia Enterobacteriaceae (Ewing, 1985). Ella está integrada por bacilos Gram negativos no esporulados, móviles con flagelos peritricos o inmóviles, aerobios-anaerobios facultativos, capaces de crecer en agar Macconkey y en medios simples con o sin agregado de NaCl, fermentadores y oxidativos en medios con glucosa u otros carbohidratos, catalasa positivos, oxidasa negativos, reductores de nitratos a nitritos, y poseedores de una proporción G+C de 39 a 59% en su DNA (Andrade, M. 2010).

Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales. En conjunto, la importancia de las enterobacterias en patología humana puede cuantificarse constatando que constituyen el 50% aproximadamente de todos los aislamientos clínicamente significativos en los laboratorios microbiológicos, y hasta el 80% de todos los bacilos Gram negativos identificados (Andrade, M. 2010).

Integran también esta familia otros géneros que se consideran en otros capítulos por su asociación con infecciones intestinales, como son Salmonella, Shigella y Yersinia. E. coli es la especie tipo del género Escherichia. Incluye gérmenes generalmente móviles, que producen ácido y gas a partir de la glucosa, la

arabinosa, y habitualmente de la lactosa y otros azúcares. Producen reacción positiva de rojo de metilo, y negativa de Vogues-Proskauer (Andrade, M. 2010).

Son inhibidos por KCN, incapaces de crecer en medios con citrato como única fuente de carbono y energía. Son H₂S, ureasa y fenilalanina negativos, pero en general son indol positivos y decarboxilan la lisina. Se clasifican en más de 170 sero grupos O, y en serotipos por la combinación de antígenos O y H flagelares (Andrade, M. 2010).

La E. coli coloniza el tracto gastrointestinal a las pocas horas de vida del niño, y establece con el huésped una relación estable de mutuo beneficio. Como integrante de la flora normal del hombre y de muchos animales, se lo considera un germen indicador de contaminación fecal cuando está presente en el ambiente, agua y alimentos, junto con otros similares agrupados bajo la denominación de "bacterias coliformes". Estas son enterobacterias que pertenecen al género Escherichia y a otros relacionados como Klebsiella, Enterobacter y Serratia, y que tienen en común la capacidad de fermentar la lactosa en un lapso no mayor de 48 horas (Andrade, M. 2010).

Son gérmenes de gran ubicuidad y capacidad de proliferación, y a la vez de fácil cultivo e identificación, y por lo tanto muy útiles como indicadores de contaminación, pero no son entero patógenos como grupo (como tampoco lo es E. Coli), y por lo tanto su presencia en alimentos, ambiente o pacientes no certifica la etiología de una infección intestinal o un brote de ETA (Andrade, M. 2010).

Es necesario hilar más fino. E. coli puede ser causa de enfermedad endógena en pacientes debilitados o en situación de alteración de la pared intestinal (peritonitis, sepsis, etc.), pero las infecciones entéricas provocadas por este germen no son causadas por las cepas que habitan normalmente el intestino, sino por líneas especialmente patógenas en esta localización (Nataro y Kaper, 1998), que se transmiten por vía fecal-oral de persona a persona o a través del agua y alimentos (Andrade, M. 2010).

2. Salmonella

a. Características microbiológicas

Guamán, V. (2014), manifiesta que el género *Salmonella* se incluye en la familia Enterobacteriaceae, integrada por bacilos Gram negativos anaerobios facultativos, son fermentadores de la glucosa, catalasa positiva, oxidasa negativo y suelen ser móviles; representa una excepción *Salmonella Gallinarum*, siempre inmóvil.

La nomenclatura de *Salmonella* es compleja. Se han usado diferentes sistemas para referir a este género. Teniendo en cuenta que estas bacterias tienen una muy importante homología general de su ADN, deberían ser caracterizadas como dos únicas especies. Esta propuesta, formulada por Le Minor y Popoff, no ha sido completamente aceptada (Guamán, V. 2014).

No obstante, la mayoría ha optado por seguir una antigua propuesta de Kaufmann, con las más recientes modificaciones (formuladas desde el Centro de Referencia colaborador de la OMS, en el Instituto Pasteur); así, se divide el género en dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*, diferenciables entre sí por características metabólicas tales como la hidrólisis del ONPG, el crecimiento en presencia de KCN y otras (Guamán, V. 2014).

La *Salmonella* entérica se subdivide, a su vez, en seis subespecies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houenae*(IV), e *indica* (VI) que corresponden a los antiguos subgéneros. Estas subespecies son diferenciables bioquímicamente. Como todas las enterobacterias, el género *Salmonella* tiene tres tipos de antígenos: somático (O), flagelar (H) y de envoltura, para *Salmonella* (Vi) (Guamán, V. 2014).

Los antígenos somáticos son termoestables y su especificidad radica en el componente polisacárido de la endotoxina, complejo proteína- lipopolisacárido. Los antígenos O se clasifican en mayores y menores; los mayores son los que definen un grupo antigénico. Así, el factor antigénico 0:4 caracteriza el antiguo

grupo B, hoy llamado O: 4, mientras que los antígenos menores tienen menor valor discriminativo. Por ejemplo, el antígeno O:12 lo presenta toda *Salmonella* perteneciente a los grupos A, B y D (Guamán, V. 2014).

Los antígenos capsulares o de envoltura sólo lo presentan algunos serotipos de *Salmonella* (Typhi y Dublin). Los antígenos flagelares son proteicos y termolábiles. Algunos serovars sólo producen un único tipo de antígeno H, siendo, en consecuencia, monofásicos. Sin embargo otros serotipos pueden producir alternativamente dos tipos de antígenos H, por lo que se denominan bifásicos. Mediante el uso de reacciones antígeno anticuerpo se determina la fórmula antigénica de una cepa y, a partir de dicha fórmula, se la clasifica en serovar o serotipo siguiendo el esquema propuesto originalmente por Kauffman y White (que agrupa todas las serovariedades conocidas, más de dos mil quinientos) (Guamán, V. 2014).

b. Patogenia

Guamán, V. (2014), manifiesta que la *Salmonella* presenta diferencias en cuanto a la especificidad del hospedero; mientras algunos serovars no tienen una estricta adaptación a un huésped, siendo capaces de producir enfermedades con diversas características en distintas especies animales y en el hombre, otros serovars sí son específicos, como *S.Gallinarum* para las aves o *S.Typhi* en el caso del hombre.

Las *Salmonellosis* humanas pueden clasificarse en dos grandes grupos: por un lado, las debidas a serotipos estrictamente humanos, que causan habitualmente síndromes tifoídicos con presencia de bacterias en la sangre, y las debidas a serotipos ubicuos, que provocan diarrea, vómitos y fiebre. La duración y entidad de esta enfermedad es variable, dependiendo del estado general del huésped, pudiendo ocasionalmente causar enfermedades generalizadas (Guamán, V. 2014).

3. *Staphylococcus aureus*

Sejia, V. (2008), menciona que desde el punto de vista estructural *S. aureus* comparte las características de los gérmenes Gram positivos y agrega algunas características distintivas. La pared celular está compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano. Se trata de un polímero polisacárido compuesto por cadenas con uniones de tipo β (1-4) no ramificadas, que contienen subunidades alternantes de ácido N-acetil murámico y N-acetil glucosamina. Las cadenas laterales de pentapéptidos se hallan conectadas al residuo de ácido murámico y tienen unión cruzada por un puente pentaglicina fijado a la L-lisina de una cadena y la Dalanina de la otra cadena.

El polímero polisacárido básico se halla también en muchos otros microorganismos, mientras la cadena de unión cruzada de pentaglicina parece ser específica de *S. aureus*. Tiene como función mantener la rigidez de la pared bacteriana y su resistencia osmótica (Sejia, V. 2008).

En la patogenia coadyuvaría al desencadenamiento de la inflamación por activación del complemento, es capaz de atraer leucocitos polimorfonucleares (PMN), estimula la producción de anticuerpos opsonizantes y tiene actividad similar a las endotoxinas de Gram negativos (Sejia, V. 2008).

El otro componente mayor de la pared son los ácidos teicoicos, que constituyen alrededor del 40% del peso de la pared. Estos ácidos son polímeros de glicerol o ribitol fosfato, azúcares y algunas veces, D-alanina. Están unidos en forma covalente al peptidoglicano. Cuando están unidos a la membrana citoplasmática se les llama ácidos lipoteicoicos. *S. aureus* posee predominantemente ácidos de ribitol fosfato, mientras que en los estafilococos coagulasa negativos estos son de glicerol fosfato (Sejia, V. 2008).

La presencia de cápsula es variable pero es importante a nivel patogénico, ya que tiene propiedades antifagocíticas. Las cepas de *S. aureus* que poseen cápsula son más virulentas en modelos animales. No es claro que la cápsula de *S. aureus* juegue un papel importante en la adherencia. Lo que si se conoce es que la

adherencia de este germen a la válvulas cardíacas y cuerpos extraños está mediada, en parte, por receptores de fibronectina en su superficie (Sejia, V. 2008).

La fibronectina es una glicoproteína importante en varias funciones de adherencia. Las cepas de *S. aureus*, que muestran grandes cantidades de receptores para la fibronectina, parecen ser más invasivas y más hábiles para adherirse. Además *S. aureus* puede presentar en su superficie receptores para el colágeno. La pared celular de *S. aureus* posee una proteína característica llamada proteína A (Sejia, V. 2008).

Esta tiene la habilidad de unirse a la porción Fc de las moléculas de inmunoglobulina G (IgG), y por tanto funciona como factor de virulencia, ya que interfiere con la opsonización y la ingestión de los microorganismos por los PMN, activando el complemento y dando lugar a reacciones de hipersensibilidad inmediata y tardía. Esta proteína es inmunogénica y se hallan anticuerpos contra ella en sujetos con infecciones graves por *S. aureus* (Sejia, V. 2008).

a. Resistencia agentes físicos y químicos

Sejia, V. (2008), menciona que este microorganismo es muy resistente a las condiciones ambientales normales. Es capaz de sobrevivir hasta tres meses en un cultivo a temperatura ambiente. Muere expuesto a temperaturas mayores de 60 °C por una hora. En cuanto a los agentes químicos, es sensible a la mayoría de los desinfectantes y antisépticos, que lo matan en pocos minutos.

b. Metabolismo

En cuanto a su forma de obtener energía es tanto a través de la fermentación como de la respiración. En cuanto a los requerimientos de cultivo, son no exigentes desde el punto de vista nutricional, creciendo en medios pobres y simples. En su relación con el oxígeno son aerobios-anaerobios facultativos (Sejia, V. 2008).

E. LA TECNOLOGÍA EN LOS ALIMENTOS FUNCIONALES

El término Alimento Funcional fue propuesto por primera vez en Japón en la década de los 80's con la publicación de la reglamentación para los "Alimentos para uso específico de salud" ("Foods for specified health use" o FOSHU) y que se refiere a aquellos alimentos procesados los cuales contienen ingredientes que desempeñan una función específica en las funciones fisiológicas del organismo humano, más allá de su contenido nutrimental (Alvídrez, A., González, E., & Jiménez, Z. 2002).

Los alimentos de este tipo son reconocidos porque llevan un sello de aprobación del Ministerio de Salud y Bienestar del gobierno japonés. Algunas de las principales funciones son las relacionadas con un óptimo crecimiento y desarrollo, la función del sistema cardiovascular, los antioxidantes, el metabolismo de xenobióticos, el sistema gastrointestinal, entre otros (Alvídrez, A., González, E., & Jiménez, Z. 2002).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, ubicada en el Km 1 ½ de la panamericana Sur en el Cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo con una duración de 120 días, distribuidos en los diferentes ensayos, las condiciones meteorológicas de la investigación se reporta en el (cuadro 5).

1. Condiciones meteorológicas

Cuadro 5. CONDICIONES METEREOLÓGICAS.

Variables	PROMEDIO
Temperatura (°C)	13,20
Humedad Relativa (%)	66,46
Precipitación (mm)	550,80
Heliofanía (h/luz)	165,15

Fuente: Estación Agro meteorológica de la F.R.N. de la ESPOCH (2016).

B. UNIDADES EXPERIMENTALES

Para el desarrollo de la presente investigación se utilizó 4500 gramos de la mezcla de cuy con harina de habas, con un tamaño de la unidad experimental de 100 gramos, con tres repeticiones cada uno, dando un total de 45 unidades experimentales, las mismas que fueron distribuidas bajo un diseño completamente al azar con un arreglo combinatorio.

C. MATERIALES, EQUIPOS E INSTALACIONES

1. Materiales

- Mesa de acero inoxidable.
- Envases para muestras.
- Guantes.
- Jabón, detergente y desinfectante.
- Escoba.
- Mandil.
- Cofia.
- Mascarilla.
- Balanza de precisión digital.
- Agitadores de acero inoxidable.
- Placas Petri film para los análisis microbiológicos.
- Estufa.
- Cajas Petri.
- Tubos de ensayo.
- Matraz Erlenmeyer.
- Vasos de precipitación.
- Frascos termo resistentes.
- Termómetro.
- Libreta de apuntes.

2. Equipos

- Cámara de flujo laminar.
- Microscopio.
- Estufas.
- Muflas.
- Autoclave.
- Refrigeradora.
- Balanzas de precisión.

- Agitadores.
- Cuenta colonias.

3. Materia prima

- Harina de habas.
- Carne de cuy.
- Microorganismos patógenos.
- Microorganismos benéficos.

4. Instalaciones

- Laboratorio de Microbiología de los Alimentos.

5. Formulaciones

Para la investigación se utilizó una mezcla de carne de cuy y harina de habas con la formulación que se reporta en el (cuadro 6).

Cuadro 6. FÓRMULA PARA LA MEZCLA DE CUY CON HARINA DE HABAS (7,5%).

Ingredientes	% en Fórmula	Forma de empleo	Origen
Carne de cuy	72,,9	Congelada	Chimborazo Ecuador
Grasa de cerdo	21,69	Congelada	Chimborazo Ecuador
Harina de habas	7,5	Hidratada	Chimborazo Ecuador
Glucosa (80%)	1	Diluida	
Sal común	2,0	Polvo	
Pimienta blanca	0,02	Polvo	
Ajo	0,2	Pepa	
Cebolla	0,2	Pepa	
Cultivo iniciador	2	Lactobacillus	

Para la investigación también se utilizó una segunda fórmula que se reporta en el (cuadro 7).

Cuadro 7. FÓRMULA PARA LA MEZCLA DE CUY CON HARINA DE HABAS (7,5%).

Ingredientes	% en fórmula	Forma de empleo	Origen
Carne de cuy	72,9	Congelada	Chimborazo Ecuador
Grasa de cerdo	21,69	Congelada	Chimborazo Ecuador
Harina de habas	7,5	Hidratada	Chimborazo Ecuador
Glucosa (80%)	1	Diluida	
Sal común	2,0	Polvo	
Pimienta blanca	0,02	polvo	
Ajo	0,2	pepa	
Cebolla	0,2	pepa	
Cultivo iniciador	2	Pediococcus	

El cuadro 8, muestra la tercera fórmula para la investigación.

Cuadro 8. FÓRMULA PARA LA MEZCLA DE CUY CON HARINA DE HABAS (7,5%).

Ingredientes	% en fórmula	Forma de empleo	Origen
Carne de cuy	72,9	Congelada	Chimborazo Ecuador
Grasa de cerdo	21,69	Congelada	Chimborazo Ecuador
Harina de habas	7,5	Hidratada	Chimborazo Ecuador
Glucosa (80%)	1	Diluida	
Sal común	2,0	Polvo	
Pimienta blanca	0,02	polvo	
Ajo	0,2	pepa	
Cebolla	0,2	pepa	
Cultivo iniciador	1	Lactobacillus	
Cultivo iniciador	1	Pediococcus	

D. TRATAMIENTO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

En la presente investigación se utilizaron tres formulaciones con tres tipos de cultivos: *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* y la mezcla de *Lactobacillus plantarum* con *Pediococcus pentosaceus*, evaluándose en 4 etapas (inicial, 24, 36, 48 y 72 horas), con tres repeticiones los cuales se analizaron bajo un diseño completamente al azar con arreglo combinatorio el mismo que se ajusta al siguiente modelo lineal aditivo:

$$Y_{ijk} = u + A_i + B_j + AB_{ij} + E_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ijk} : Valor estimado de la variable.

u : media general.

A_i : Efecto de los microorganismos benéficos.

B_j : Efecto del tiempo de evaluación.

AB_{ij} : Efecto de la interacción AB.

E_{ijk} : Efecto de la aleatorización de las unidades experimentales.

El esquema del experimento que fue utilizado en la presente investigación se describe en el (cuadro 9).

Cuadro 9. ESQUEMA DEL EXPERIMENTO.

Microorg. benéficos	Evaluación Horas.	Código	Repet.	TUE/g	UE/trat.
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Inicial	A1B1	3	100	300
	24	A1B2	3	100	300
	36	A1B3	3	100	300
	48	A1B4	3	100	300
	72	A1B5	3	100	300
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Inicial	A2B1	3	100	300
	24	A2B2	3	100	300
	36	A2B3	3	100	300
	48	A2B4	3	100	300
	72	A2B5	3	100	300
<i>Lacto+Pediococcus</i>	Inicial	A3B1	3	100	300
	24	A3B2	3	100	300
	36	A3B3	3	100	300
	48	A3B4	3	100	300
	72	A3B5	3	100	300
TOTAL					4500

T.U.E = Tamaño de la unidad Experimental en g.

E. MEDICIONES EXPERIMENTALES

1. Carga de Microorganismos

- *Lactobacillus plantarum*, UFC/g.
- *Pediococcus pentosaceus*, UFC/g.
- *Escherichia coli*, UFC/g.
- *Salmonella ssp*, +/-.
- *Staphylococcus aureus*, UFC/g.

F. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA

Los resultados experimentales fueron sometidos a los siguientes análisis:

- Análisis de varianza (ADEVA) bajo un Diseño Completamente al Azar con un arreglo combinatorio, utilizando el sistema estadístico Infostat.
- Curva de regresión en función al tiempo.
- Comparación de medias por DUNCAN $P < 0.05$.

G. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Para la investigación se utilizó 4500 g de una mezcla de cuy con harina de habas dentro de laboratorio.

El estudio consiste en evaluar el efecto antagónico de cultivos iniciadores *Lactobacillus Plantarum*, *Pediococcus Pentosaceus* y la mezcla de los dos (*Lactobacillus Plantarum*, *Pediococcus Pentosaceus*) frente a patógenos de referencia (*Escherichia Coli.*, *Salmonella ssp.* y *Staphylococcus Aureus*) en una mezcla de cuy y harina de habas. La investigación es bajo un Diseño Completamente al Azar con un arreglo combinatorio.

H. METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN

Para evaluar el efecto antagónico del cultivo iniciador sobre el desarrollo de microorganismos patógenos de referencia (*Escherichia Coli.*, *Salmonella ssp.* y *Staphylococcus Aureus*) en la mezcla de cuy y harina de habas se realizó el siguiente ensayo:

Los experimentos se desarrollaron, en placas petri, por triplicado. Los patógenos se inocularon en el orden de 10^4 ufc/mL y el cultivo iniciador de 10^9 ufc/mL.

Las muestras fueron inoculadas con cada uno de los tipos de cultivo iniciador (*Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*) individualmente y con la mezcla de los dos frente a los patógenos de referencia por separado.

La temperatura de incubación fué de 22 a 24 °C a los tiempos 0, 24, 48 y 72 horas.

Se utilizó medios selectivos para el conteo de: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella ssp*, *Escherichia coli* y cultivo iniciador.

Se obtuvieron las curvas de crecimiento para el cultivo iniciador y los patógenos de referencia.

Se comparó la supervivencia de cada uno de los patógenos por separado.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. COMPORTAMIENTO DE MICROORGANISMOS BENÉFICOS

1. *Lactobacillus plantarum*

En el cuadro 10, se observa el desarrollo del *Lactobacillus plantarum* en la mezcla de cuy con harina de habas identificando inicialmente una carga microbiológica de 9,92 UFC/g, los cuales fueron creciendo significativamente a través del tiempo puesto que a las 72 horas se registró una carga microbiológica de 12,59 UFC/g, de esta manera se puede manifestar que este microorganismo que se considera benéfico se desarrolla adecuadamente en la mezcla a pesar de estar presentes microorganismos patógenos tales como la *Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *Staphylococcus aureus*. A su vez Olivera, J. (2011), menciona que el crecimiento de los *Lactobacillus* pueden ser mesófilos o termófilos, esto se relaciona con la temperatura ambiental de la carne; Existe variación a nivel de especie con respecto a la capacidad de crecer a 10 y 45 °C.

El Gráfico 1, muestra que el desarrollo de los microorganismos *Lactobacillus plantarum* en la mezcla de cuy con harina de habas está relacionado significativamente ($P = 1,21E-12$) del tiempo, el 98,87 % de presencia de *Lactobacillus plantarum* depende del tiempo a una regresión de primer orden, además se puede determinar que por cada hora que transcurre el microorganismo benéfico crecen en 0,0379 UFC/g. Además González, B., Domínguez, R., Espinosa, R., & Alcocer, B. (2007), mencionó que el jugo de Aloe vera es un sustrato vegetal que puede ser utilizado como medio de propagación in vitro para las especies probióticas *L. plantarum* y *L. casei* obteniendo tasas de crecimiento del orden de 10^9 y 10^{11} respectivamente a las 24 horas de fermentación.

Cuadro 10. DESARROLLO DE MICROORGANISMOS BENÉFICOS EN LA MEZCLA DE CUY.

Variables	Periodo de Evaluación (días)					E.E.	Prob.
	0	24	36	48	72		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	9,92 e	10,85 d	11,27 c	11,94 b	12,59 a	0,02	0,00
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	4,96 e	5,18 d	5,30 c	5,44 b	5,85 a	0,02	0,00
<i>Lactobacillus+Pediococcus</i>	9,95 e	10,76 d	11,55 c	11,98 b	12,69 a	0,01	0,00

Letras iguales no difieren significativamente según Duncan ($P < 0,05$).

EE: Error estadístico.

Prob>0,05: no existen diferencias estadísticas.

Prob<0,05: existen diferencias significativas.

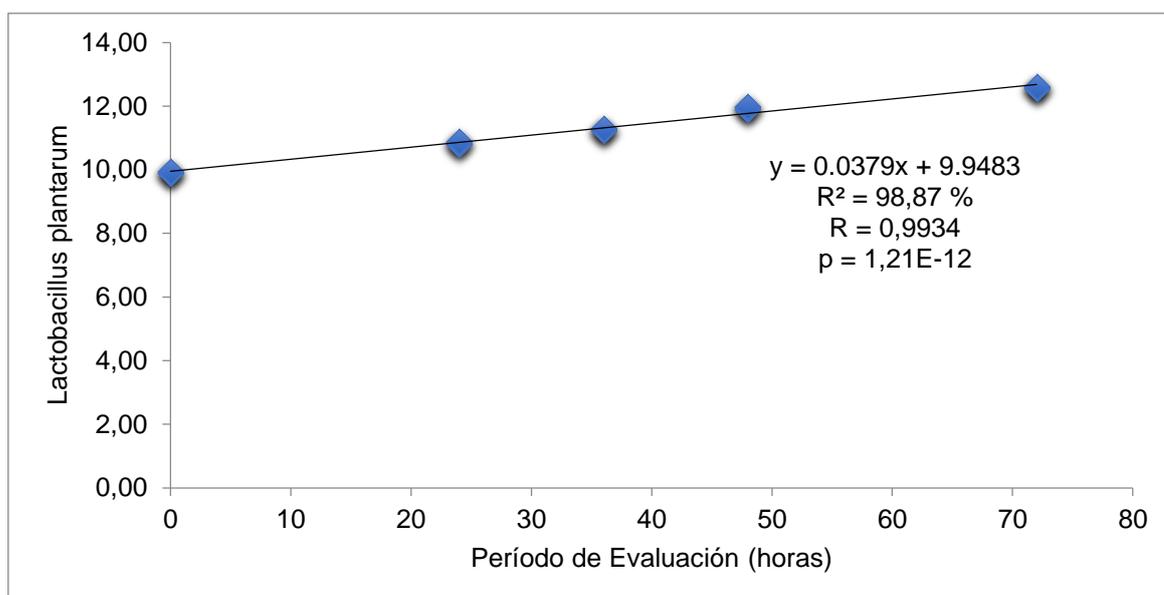


Gráfico 1. Crecimiento del *Lactobacillus plantarum* como cultivo iniciador en la mezcla de cuy con harina de habas en función del tiempo (horas).

2. *Pediococcus pentosaceus*

El desarrollo de los *Pediococcus pentosaceus* a las 0 horas, obtiene una carga microbiológica de 4,96 UFC/g los cuales fueron incrementando significativamente a medida que transcurría el tiempo (horas) hasta las 72 horas, puesto que registró una carga microbiológica de 5,85 UFC/g, de esta manera se puede manifestar que este tipo de microorganismos crecen adecuadamente en la mezcla, pese a que se inocularon simultáneamente frente a microorganismos patógenos como la *Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *Staphylococcus aureus*.

Olivera, J. (2011), encontró que el género de *Pediococcus* forma parte de la Familia Lactobacillaceae y presenta once especies; estas bacterias Gram + son cocos esféricos, jamás ovoides o elongados, tienen 0,5 a 0,8 μm de diámetro y no son móviles, se disponen de a pares, pero también en tétradas debido a que se dividen en dos planos: *Pediococcus spp*: Está constituido por especies homo-fermentativas estrictas y hetero-fermentativas facultativas, que generan L-ácido láctico o L-ácido láctico y D-ácido láctico como producto de la fermentación, característica importante que sirve para la conservación de productos alimenticios.

El gráfico 2, ilustra el crecimiento de los microorganismos *Pediococcus pentosaceus* en la carne de cuy con harina de habas está relacionado significativamente ($P = 3,66E-19$) en función del tiempo, el 96,67 % de presencia de *Pediococcus pentosaceus* depende del tiempo a una regresión de primer orden, de la misma manera se puede manifestar que por cada hora que transcurre en este medio de cultivo el desarrollo de estos microorganismos benéficos crecen en 0,0123 UFC/g, Olivera, J. (2011), identificó que el *Pediococcus pentosaceus* puede crecer a pH 5,0, pero no a pH 9,0; Son microorganismos mesófilos, la mayoría de las especies pueden crecer a 35⁰C; a 10 Y 45⁰C la capacidad de crecimiento varía según la especie.

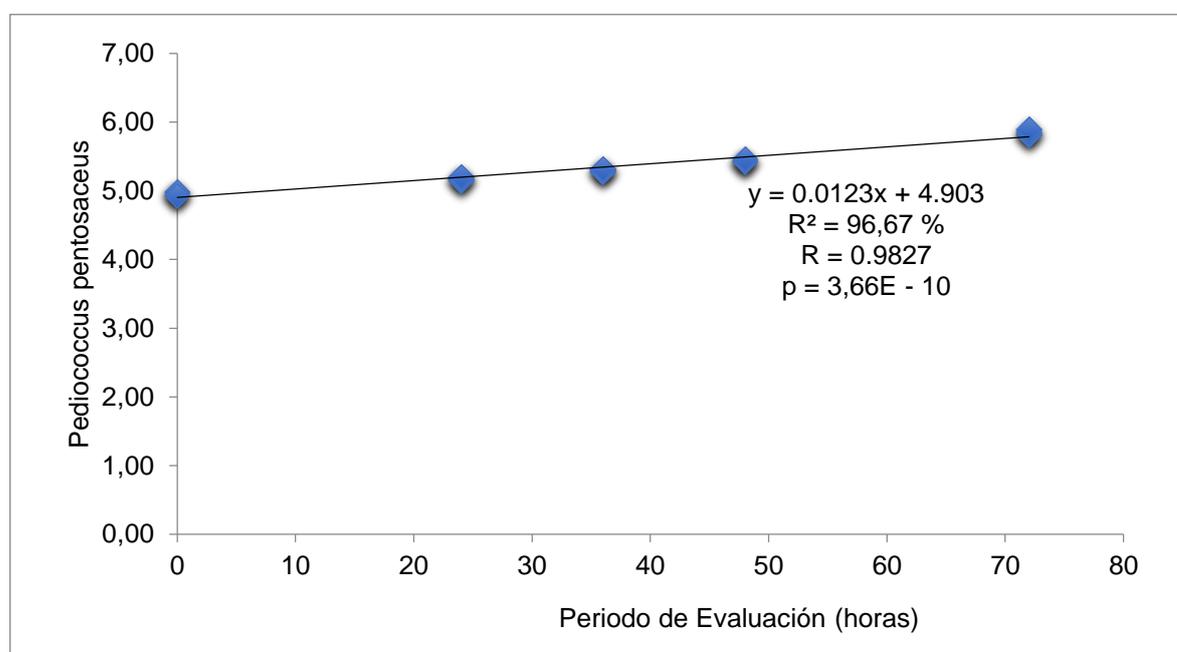


Gráfico 2. Crecimiento del *Pediococcus pentosaceus* en la mezcla de cuy con harina de habas en función del tiempo (horas).

3. *Lactobacillus + Pediococcus*

Al inocular *Lactobacillus plantarum* + *Pediococcus pentosaceus* en la mezcla de cuy con harina de habas, se identificó una carga microbiológica de 9,95 UFC/g los cuales incrementaron significativamente a medida que transcurría el tiempo, hasta las 72 horas se registró una carga microbiológica de 12,69 UFC/g.

Vidal, C. (2012), manifiesta que los microorganismos pertenecientes a la familia Lactobacillaceae son importantes cultivos iniciadores, bacterias como *Lactobacillus plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. bien*, *Lb. curvatus*, *Lb. lactis* y *Lb. Fermenti* se utilizan a menudo.

El gráfico 3, muestra el desarrollo de los microorganismos tales como los *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus pentosaceus* en la mezcla de cuy con harina de habas, aludiendo que está relacionado significativamente ($P = 1,95E-11$) en función del tiempo, el 98,23 % de presencia de *Lactobacillus* + *Pediococcus* depende del tiempo a una regresión de primer orden, además se puede manifestar que por cada hora que transcurre este microorganismos benéfico crecen en 0,0394 UFC/g, demostrándose que el medio de cultivo se desarrolla perfectamente en dicha mezcla. Vidal,C. (2012), manifiesta que las especies más comunes son *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus* y *P. cerevisiae*. *P. acidilactici* fermenta los azúcares más rápidamente a temperaturas alrededor de 40 °C. *P. acidilactici*, forma ácido láctico a partir de la glucosa, galactosa, arabinosa y xilosa. *Pediococcus* spp; generalmente se añaden a niveles de 10^5 - 10^6 por gramo de embutido. Los *Pediococcus* spp, presentes en la masa de salami mueren poco después de que el producto se acidifica, mientras que *Lactobacillus* spp, pueden seguir con vida.

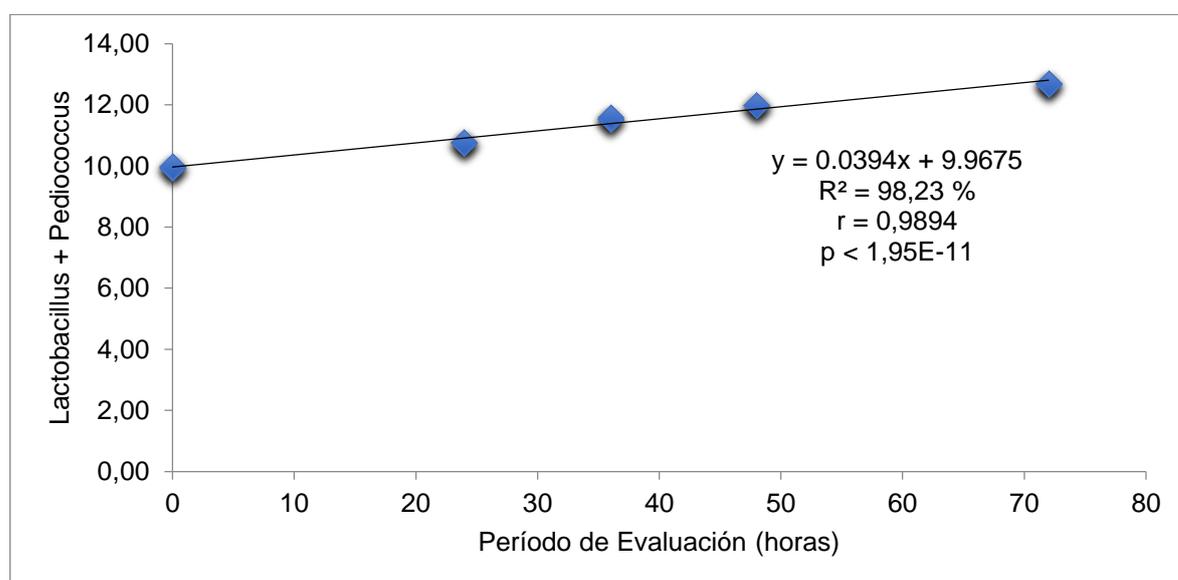


Gráfico 3. Crecimiento del *Lactobacillus* + *Pediococcus* en la mezcla de cuy con harina de habas en función del tiempo (horas).

B. COMPORTAMIENTO DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS

1. Escherichia coli

El cuadro 11, muestra el desarrollo de microorganismos patógenos en la mezcla (cuy con harina de habas) frente a cultivos iniciadores (horas).

Cuadro 11. DESARROLLO DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN LA MEZCLA DE CUY CON UN CULTIVO INICIADOR Y HARINA DE HABAS EN INTERACCIÓN CON DIFERENTES TIEMPOS (horas).

Inter. AB	Escherichia coli		Salmonella spp		Staphylococcus aureus	
M1B0	4,23	f	4,38	e	4,74	i
M1B24	2,18	d	1,72	c	2,97	g
M1B36	1,10	c	0,00	a	1,98	e
M1B48	0,40	b	0,00	a	0,87	c
M1B72	0,00	a	0,00	a	0,00	a
M2B0	4,23	f	4,39	e	4,73	i
M2B24	3,02	e	3,21	d	3,08	h
M2B36	2,21	d	1,63	b	2,57	f
M2B48	1,08	c	0,00	a	1,15	d
M2B72	0,00	a	0,00	a	0,00	a
M3B0	4,29	f	4,39	e	4,75	i
M3B24	2,10	d	1,72	c	2,98	g
M3B36	1,02	c	0,00	a	1,95	e
M3B48	0,37	b	0,00	a	0,75	b
M3B72	0,00	a	0,00	a	0,00	a
	0,0214		0,0016		0,0031	
	5,25E-08		4,25E-29		7,95E-11	

Letras iguales no difieren significativamente según Duncan ($P < 0,05$).

EE: Error estadístico.

Prob>0.05: no existen diferencias estadísticas.

Prob<0.05: existen diferencias significativas.

Al analizar su comportamiento se pudo determinar una carga microbiana de *Escherichia coli* con valores de 4,23, 4,23 y 4,29 UFC/g, los mismos difieren significativamente al evaluar esta carga microbiológica de este patógeno, puesto

que a las 72 horas la *Escherichia coli* ha desaparecido completamente, de esta manera se puede manifestar que *Lactobacillus plantarum* controla a la *Escherichia coli* en este tiempo.

Andrade, M. (2010), señala que la *Escherichia coli* trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución. En conjunto, la importancia de las enterobacterias en patología humana puede cuantificarse constatando que constituyen el 50% aproximadamente de todos los aislamientos clínicamente significativos en los laboratorios microbiológicos, de esta manera se puede manifestar que causa daño en la salud del hombre además en la de los seres vivos, sin embargo cuando se propicia un ambiente diferente con antibacterianos o microorganismos antagónicos estos pueden controlarse adecuadamente.

Además Montoya, C., Estrada, M., & Gutiérrez, R. (2006), dentro de estudio realizado en inhibición de *Lactobacillus sp.* Sobre *E coli*; encontraron que el comportamiento de la actividad es similar a temperaturas de 0 y 25 °C durante el tiempo de estudio, encontrándose una mejor actividad al día 10; lo contrario ocurre a 4 °C donde la actividad inhibitoria es mucho menor y disminuye con el tiempo

El gráfico 4, demuestra que la presencia de *Escherichia coli* en la mezcla de cuy con harina de habas está relacionado significativamente ($P = 5,51E-23$) en función del tiempo, el 89,85% de este microorganismo dependen del tiempo a una regresión lineal, además se puede manifestar que por cada hora transcurrida, estos microorganismos decrecen en 0,0607 UFC/g.

Los valores reportados de este microorganismo se encuentran debajo del límite máximo 1×10^5 UFC/g (10000) de *Escherichia coli* permitido por la Norma INEN 1338 2012 para productos crudos.

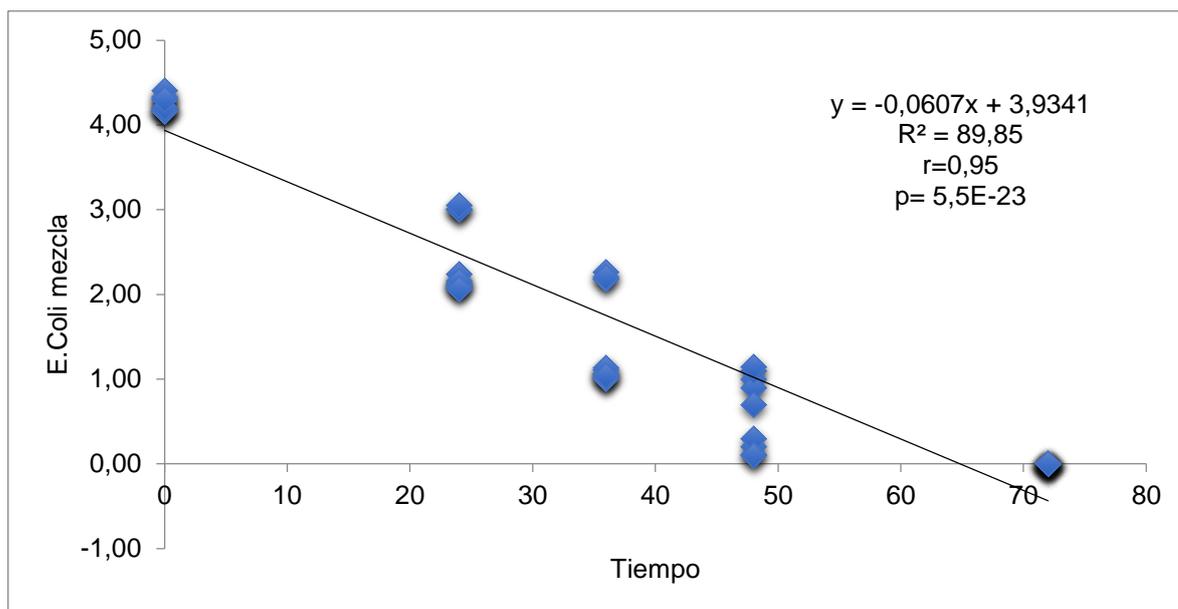


Gráfico 4. *Escherichia coli* en función del tiempo (horas).

2. *Salmonella spp*

Durante la presencia de *Salmonella spp* en la mezcla de cuy con harina de habas, al someter a una inoculación de *Lactobacillus*, *Pediococcus* y su combinación, se identificó una carga microbiana de 4,38, 4,39, y 4,39 UFC/g, deduciendo que los tratamientos con *Lactobacillus* y la mezcla (*Lactobacillus plantarum* + *Pediococcus pentosaceus*) no difieren significativamente en relación al tiempo de decrecimiento de la salmonella puesto que este microorganismo patógeno se destruye en su totalidad a las 36 horas, mientras que al utilizar *Pediococcus pentosaceus* este microorganismo desaparece a las 48 horas, por lo que se demuestra que no existe diferencias al utilizar *Lactobacillus plantarum* y su combinación (*Lactobacillus P.* + *Pediococcus*) siendo estos más efectivos que los *Pediococcus pentosaceus*, por controlar en menor tiempo a los patógenos como la salmonella. Los valores emitidos en este estudio concuerdan con la NTE INEN 1338:2012 la cual manifiesta que la *salmonella* debe tener ausencia para poder aceptar el producto crudo.

El gráfico 5, Con relación a la presencia de *Salmonella spp* en la carne de cuy con harina de haba está relacionado significativamente ($P = 2,26 E-15$) en función del tiempo; el 77,15% de *Salmonella spp* en la mezcla dependen del tiempo de

evaluación a una regresión lineal, de la misma manera se observa que este patógeno decrece por cada hora transcurrida un 0,0641 UFC/g.

Montoya, C. Estrada, M. & Gutiérrez, R. (2006), en un estudio realizado muestra que el *Lactobacillus plantarum* fue estable en el tiempo de estudio frente a *Salmonella* sp.; a las diferentes temperaturas; se lograron observar pequeñas variabilidades; así a 4 °C, la actividad bactericida disminuyó desde el día 10 hasta el día 30. En cambio a 25 °C la actividad bactericida permaneció constante hasta el día 20.

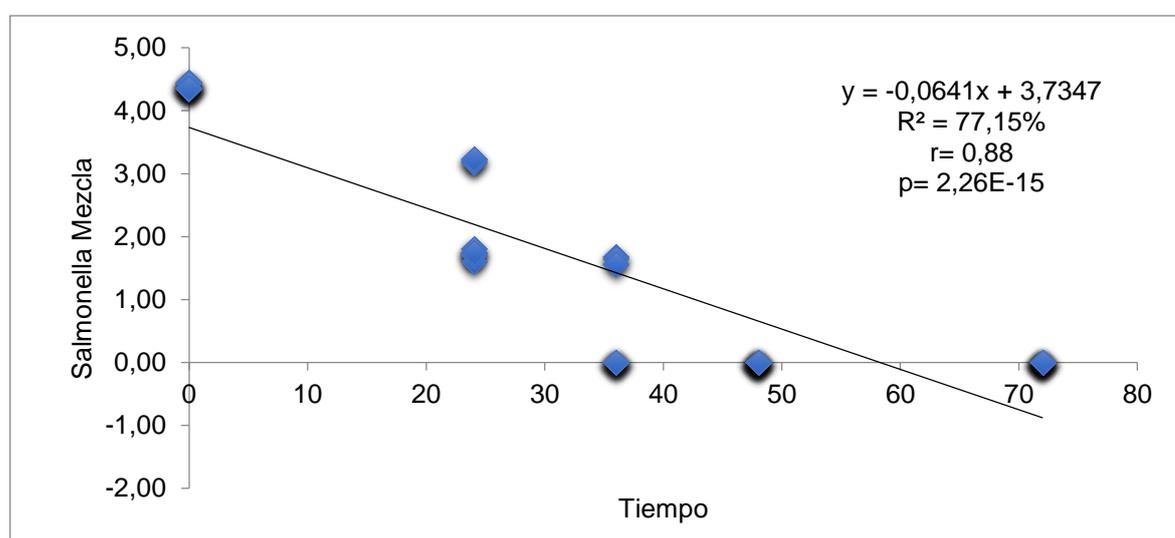


Gráfico 5. *Salmonella* spp en función del tiempo (horas).

3. *Staphylococcus aureus*

Se identificó la carga microbiológica del *Staphylococcus aureus* que se inoculó en la mezcla de cuy con harina de habas al someter en presencia del *Lactobacillus*, *Pediococcus* y su combinación en el producto fresco, se pudo valores de 4,74, 4,73 y 4,75 UFC/g, los mismos que tienden a decrecer de forma significativa a partir de las 24 horas, y se controló en su totalidad a las 72 horas, por lo que se puede manifestar que tanto los microorganismos *Lactobacillus* como los *Pediococcus* son eficaces para controlar este patógeno. los valores reportados de bacterias patógenas se encuentran debajo del límite máximo 1×10^4 (40000) UFC/g de *Staphylococcus aureus* permitido por la Norma INEN 1338 2012 para productos crudos.

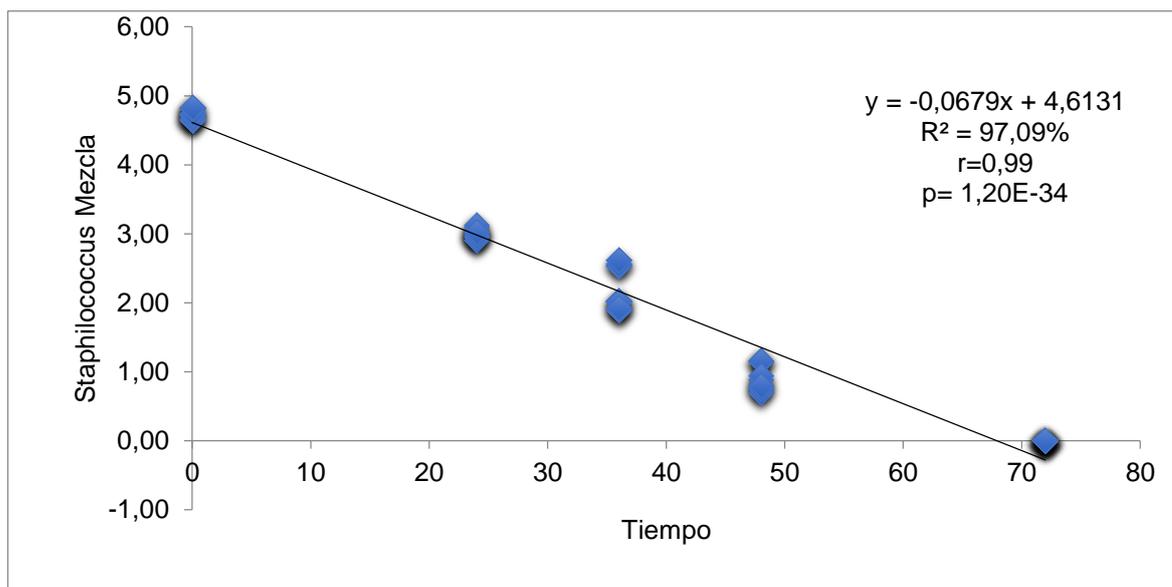


Gráfico 6. *Staphylococcus aureus* en función del tiempo (horas).

En el gráfico 6, observamos que la presencia de *Staphylococcus aureus* está relacionado significativamente ($P = 1,20E-34$) en función del tiempo, el 97,09 % de presencia de *Staphylococcus aureus* dependen del tiempo a una regresión de lineal, además se puede manifestar que por cada hora transcurrida decrece en 0,069 UFC/g. Sejia, V. (2008), nos ilustra que *S. aureus* puede poseer resistencia para diferentes antimicrobianos, en general los *Staphylococcus* aislados de infecciones comunitarias, hasta hace poco tiempo, no poseían muchos genes de resistencia salvo por la producción de penicilinasa.

C. INTERACCIÓN ENTRE MICROORGANISMOS BENÉFICOS Y PERJUDICIALES

1. *Lactobacillus plantarum*

El gráfico 7, muestra la reacción que existe dentro de la mezcla de cuy y harina de habas al someter a un cultivo de microorganismos benéficos como el *Lactobacillus plantarum*, los mismos que se desarrollaron significativamente ($P = 2,17E - 10$), además se debe manifestar que el 96 % de desarrollo de este tipo de microorganismos depende del período de evaluación y por cada hora que transcurre, la proliferación de este microorganismos es de 0,03 unidades. La presencia de la *Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *Staphylococcus aureus*, está relacionado significativamente ($P = 2,39E-05$, $1,59E-04$ y $3,37E-07$

respectivamente) a una regresión lineal, de la misma manera se puede determinar que el 76, 68 y 87 % de decrecimiento de estos microorganismos patógenos corresponden al periodo de estar en presencia de las bacterias benéficas (*Lactobacillus plantarum*), de la misma manera se puede determinar que por cada hora transcurrida dentro de la mezcla (cuy y harina de habas con cultivo iniciador), los microorganismos patógenos se reducen en 0,06 unidades respectivamente, notándose que a medida que transcurre el tiempo de permanencia de microorganismos patógenos frente a los microorganismos benéficos, estos se van destruyendo, debiéndose principalmente a que existe un efecto antagónico entre el *Lactobacillus plantarum* frente a patógenos de referencia (*Escherichia coli*, *Salmonella spp* y los *Staphylococcus aureus*).

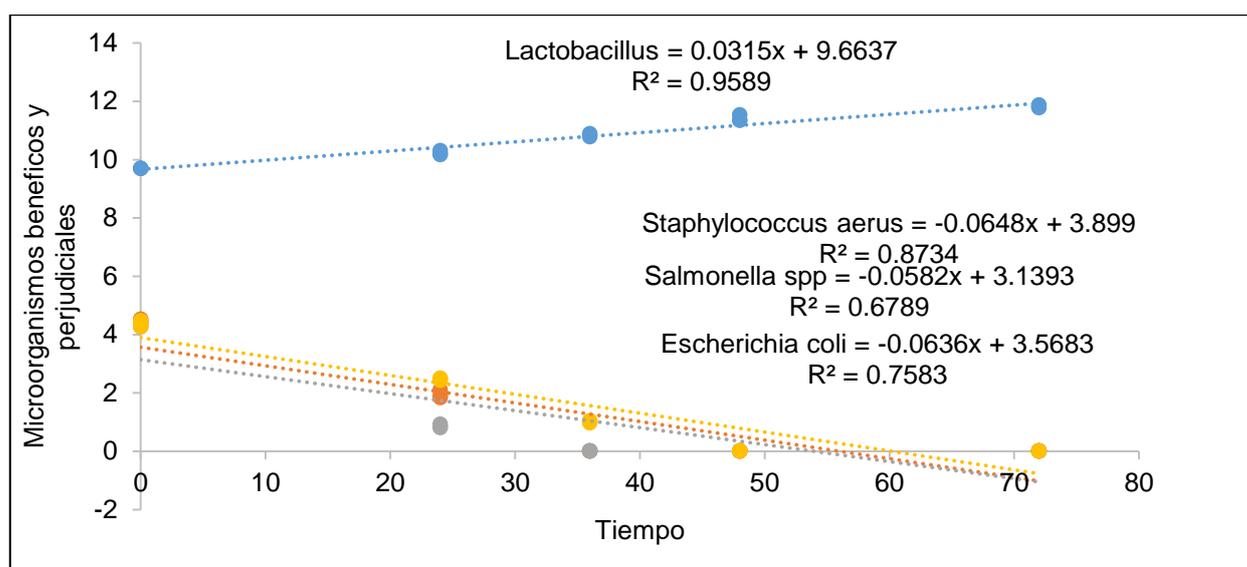


Gráfico 7. Antagonismo de *Lactobacillus plantarum* frente a microorganismos de referencia (*Escherichia coli*, *salmonella ssp*, y *Staphylococcus aureus*) en la mezcla de cuy con harina de habas en función del tiempo (horas).

2. *Pediococcus pentosaceus*

Al aplicar en la mezcla de cuy y harina de habas microorganismos tales como los *Pediococcus pentosaceus* en función de cultivo iniciador, estos tuvieron un desarrollo significativo de ($P = 1,15 E - 07$), además se debe manifestar que el 89 % del desarrollo de estos microorganismos se debe al periodo de evaluación y por cada hora que transcurre, la proliferación de microorganismos es de 0,01 UFC/g.

En relación a la presencia de los microorganismos patógenos como la *Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *Staphylococcus aureus*, está relacionado significativamente ($P = 1,55E-04$, $2,74E-04$ y $2,14E-06$ respectivamente) a una regresión lineal, además se puede manifestar que el 68, 65 y 83 % de decrecimiento de estos patógenos corresponden al periodo de estar en presencia de la bacteria benéfica, de la misma manera se determina que por cada periodo de permanencia estos microorganismos se reducen en 0,06, 0,05 y 0,07 unidades respectivamente, pudiéndose notar que a medida que transcurre el tiempo de permanencia del microorganismo patógeno frente al *Pediococcus pentosaceus*, estos se van eliminando, esto se debe al efecto antagónico que existe entre los microorganismos en la evaluación (*Pediococcus pentosaceus*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp* y los *Staphylococcus aureus*) (gráfico 8)

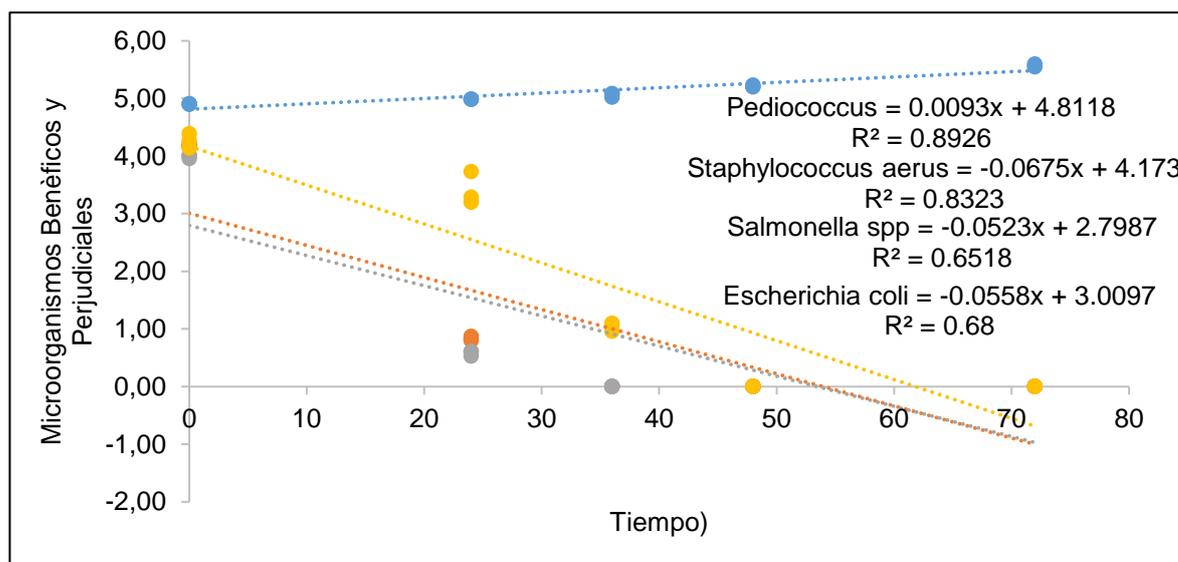


Gráfico 8. Antagonismo del *Pediococcus pentosaceus* frente a microorganismos de referencia (*Escherichia coli*, *salmonella spp*, y *Staphylococcus aureus*) en la mezcla de cuy con harina de habas en función del tiempo (horas).

3. *Lactobacillus + Pediococcus*

El crecimiento de *Lactobacillus plantarum* + *Pediococcus pentosaceus* en la formulación a base de carne de cuy y harina de habas corresponde a un modelo lineal el mismo que se considera altamente significativo ($P = 1,76E-011$), además el 97 % del crecimiento depende del tiempo, de la misma manera se puede notar

que por cada día que transcurre el crecimiento de estos dos tipos de bacterias benéficas es de 0,40 unidades, esto se debe a que los microorganismos se desarrollan en cultivos adecuados tales como la carne de cuy, puesto que este medio es ideal para el desarrollo de microorganismos.

Con relación al desarrollo de los microorganismos patógenos, tanto la *Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *Staphylococcus aureus*, a medida que transcurre el tiempo, estos patógenos reducen significativamente ($P = 3,79E-05$, $9,35E-05$ y $4,13E-07$ UFC/g respectivamente), esto se debe a que a medida que transcurre el tiempo, los microorganismos patógenos reducen además, de esta manera se puede mencionar que el 74, 70 y 97 % de patógenos reducen estadísticamente, por otro lado se puede mencionar que por cada hora que transcurre, la reducción de microorganismos como la *Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *Staphylococcus aureus* decrecen en 0,05, 0,05 y 0,06 unidades respectivamente, de esta manera se puede manifestar que, existe antagonismo entre los microorganismos benéficos y patógenos, debido a que ciertos microorganismos pueden desaparecer a partir de las 35 horas (gráfico 9).

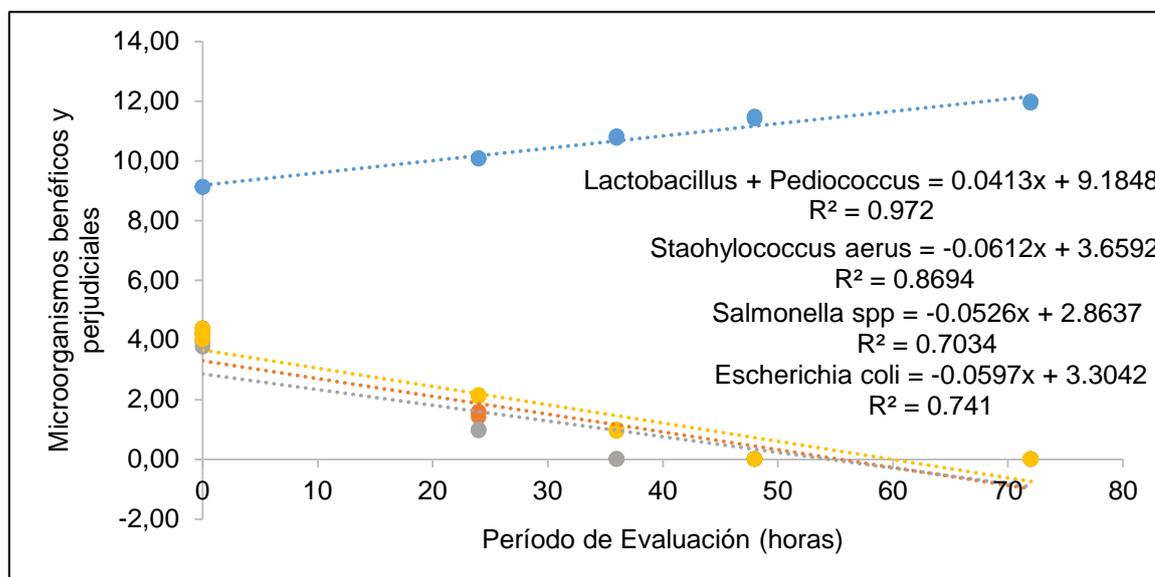


Gráfico 9. Antagonismo de *Lactobacillus plantarum* + *Pediococcus pentosaceus* frente a microorganismos perjudiciales (*Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *Staphylococcus aureus*) en la mezcla de cuy con harina de habas en función del tiempo (horas).

CONCLUSIONES

- El crecimiento de los microorganismos como *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* y su combinación fue directamente proporcional en función del tiempo, determinándose que estos microorganismos desarrollan adecuadamente dentro de la formulación aplicando carne de cuy más harina de habas.
- La utilización de *Lactobacillus plantarum* a las 36 horas controló la presencia de *salmonella spp*, siendo más eficaz y específica, aunque se puede manifestar que tanto este cultivo iniciador como la combinación (*Lactobacillus plantarum* + *Pediococcus pentosaceus*) es eficaz para controlar la *Escherichia coli*, *salmonella spp* y *Staphylococcus aureus*.
- Al utilizar *Lactobacillus plantarum* dentro de la investigación, los resultados obtenidos demuestran que existe una mayor viabilidad económica con relación al tratamiento combinado, siendo este (*Lactobacillus plantarum*) el mejor de los tratamientos utilizados.
- Mientras los microorganismos benéficos crecen en relación al tiempo en la carne de cuy más harina de haba, los microorganismos patógenos decrecen, por lo tanto se puede manifestar que existe antagonismo entre los *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* y los microorganismos patógenos de referencia (*Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *Staphylococcus aureus*).

V. RECOMENDACIONES

- Utilizar microorganismos iniciadores como los *Lactobacillus plantarum*, en conservación de la carne cuy con harina de haba, puesto que controlan adecuadamente la presencia de microorganismos patógenos como la *Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *Staphylococcus aureus*.
- Evaluar a los microorganismos benéficos en diferentes tipos de carnes, conservas y analizar el desarrollo de microorganismos patógenos.
- Analizar el antagonismo de los microorganismos benéficos frente a diferentes microorganismos patógenos perjudiciales y determinar su comportamiento biológico.

VI. LITERATURA CITADA

1. ALDANA, L. 2010. Manual Técnico Agrícola Producción comercial y de Semilla de Haba. 1a ed. Guatemala. Edición ICTA. pp. 45-56.
2. ANDRADE, M. (2010). Escherichia coli. In Identificación de viro tipos (pp. 49–68). Retrieved from <http://www.bvsops.org.uy/pdf/coli.pdf>.
3. ALVÍDREZ, A., González, E., & Jiménez, Z. (3 de Julio de 2002). respyn.uanl.mx. Recuperado el 4 de julio de 2016, de respyn.uanl.mx:http://www.respyn.uanl.mx/iii/3/ensayos/alimentos_funcionales.html
4. AMMOR, S. et al., (2005). Characterization and selection of Lactobacillus sakei strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures. Food Microbial. Vol.22, N°6. pp. 6-8
5. ARGOTE, F., VELASCO, R., PAZ, P. C., & CLAVES, P. (2007). Estudio de métodos y tiempos para obtención de carne de cuy (Cavia Porcellus) empacada a vacío study of methods and times for obtencion of meat of cuy (Cavia Porcellus) vacuum packed. Revista Facultad de Ciencias Agrarias Biotecnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial.Vol 2. pp. 103–111.
Recuperado:<http://revistabiotecnologia.unicauca.edu.co/revista/index.php/biotecnologia/article/view/65>.
6. ARO, J & GALLEGOS, E. (2013). Efecto de cultivos iniciadores en la proteólisis y su característica sensorial en salchichas fermentadas. Vol 15 Nro 1. Perú.pp.31-35.
7. BELDARRAÍN, T. et al., 2008. Caracterización de cultivos iniciadores en productos cárnicos. Habana- Cuba. Vol 21. No 2. pp 8 – 13.

8. CARBONERA, N. & ESPIRITU SANTO, M. (2010). Actividad de *Lactobacillus plantarum* en la fermentación de anchoíta. Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos. Escuela de Química y Alimentos. Universidad Federal de Río Grande. Sao Paulo. pp. 13-17.
9. CHÁVEZ, S. (2013). PROCUY WANKA. Tecnologías de producción y comercialización de carne de cuy procesada para el mercado nacional y de exportación. SEPAR. Primera edición, noviembre 2013. Lima-Perú.
10. ESCAES, L. (2010). Mejorando la Crianza de Cuyes en Cutervo. pp. 3-5.
11. GONZÁLEZ, B., DOMÍNGUEZ, R., ESPINOSA, R., & ALCOCER, B. (2007). Aloe vera como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* y *L. casei* USE OF Aloe vera JUICE AS SUBSTRATE FOR GROWTH OF *Lactobacillus plantarum* and *L. casei*. *Ciencia Y Tecnología Alimentaria*, 6(2), 152–157.
Recuperado: <http://doi.org/10.1080/11358120809487640>.
12. GUAMÁN, V. (2014, April 30). Introducción-Características microbiológicas. Cuenca.
13. HERNÁNDEZ, A., & FERNANDEZ, L. (2005). Artículos Técnicos TIPOS DE CUYES. Asociación Cubana de Producción Animal, pp.42–44.
14. LLERENA, R. (2007). Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. pp. 12-15. Recuperado en: <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
15. MACÍAS, J., & VINCES, R. (2011). “Elaboración de Sopa Instantánea a Partir de Harina de Haba.” ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL. pp. 4.5.

16. MONTOYA, C., ESTRADA, M., & GUTIÉRREZ, R. (2006). Evaluación In Vitro del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus* sp. contra *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*. *Mundo Lácteo Y Cárnico* 2. pp. 11–16. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12915.x>.
17. NTE INEN 1338:2012. CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS. PRODUCTOS CÁRNICOS CRUDOS, PRODUCTOS CÁRNICOS CURADOS - MADURADOS Y PRODUCTOS CÁRNICOS PRECOCIDOS – COCIDOS REQUISITOS.
18. OLIVERA, J. (2011, July). Caracterización tecnológica de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de la leche., p. 45. Uruguay. Retrieved from <http://www.bib.fcien.edu.uy/files/etd/pasan/uy24-15316.pdf>.
19. RAMÍREZ, J. et al., (2011). Bacteria Lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente* N. 7 ISSN – 0713. 2011.
20. SARABIA, L. (2011). “Efecto del Uso de Bactoferm™ LHP (*Pediococcus acidilactici* & *Pediococcus pentosaceus*), Bactoferm™ F-RM-52 (*Lactobacillus curvatus* & *Staphylococcus carnosus*), Bactoferm™ F-LC (*Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus* and *Staphylococcus xylosus*) y Cultivo lácteo SLB 953 (*Lactobacillus bulgaricus* & *Streptococcus thermophilus*) en la Elaboración de Chorizo (tipo Ambateño) Madurado”. *Ambato*. pp. 65-78.
21. SEJIA, V. (2008). Etiopatogenia microbiológica. *Etiopatogenia Microbiológica*, III (16), 255–272. Retrieved from <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Staphylococcus.pdf>.
22. SOTO, R et al., (2009). Viabilidad de un microorganismo probiótico cárnico fermentado tipo salami. *Universidad de las Américas Puebla*. San Andrés Cholula. México. pp. 113-120.

23. VIDAL, C. (2012). UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA UNAD. Programa de ingeniería de alimentos. Programa de ingeniería de alimentos. pp. 132–133.
24. WALDIR, E. et al., (2007). Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. Disponible en <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/biologia/biologiaNEW.htm>. Rev. Perú. (Diciembre, 2007). Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM. pp. 271-275.
25. ZULLY, R., & HERRERA, E. (2012, February). CRIANZA DE CUY MANEJO TECNIFICADO. Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015. pp. 3. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.

ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza *Escherichia coli* en la mezcla de cuy con harina de habas.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Microorganismos	Tiempo	Repeticiones		
		I	II	III
M1	0	4,17	4,32	4,20
M1	24	3,01	3,00	3,05
M1	36	2,26	2,18	2,20
M1	48	1,00	1,10	1,15
M1	72	0,00	0,00	0,00
M2	0	4,16	4,33	4,21
M2	24	2,13	2,24	2,16
M2	36	1,06	1,11	1,13
M2	48	0,90	0,20	0,11
M2	72	0,00	0,00	0,00
M3	0	4,17	4,40	4,30
M3	24	2,12	2,10	2,07
M3	36	1,01	1,02	1,04
M3	48	0,70	0,30	0,10
M3	72	0,00	0,00	0,00

ANALISIS DE VARIANZA

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher	P. Fisher
Total	59	106,27			
Microorganismos	2	2,93	1,46	102,43	1,77E-17
Tiempo	4	100,41	25,10	1758,05	8,79E-49
Lineal	1	95,77	95,77	6707,25	1,29E-50
Cuadrático	1	4,22	4,22	295,57	2,11E-21
Cúbico	1	0,35	0,35	24,58	1,06E-05
Cuártico	1	0,07	0,07	4,78	0,034
Inter. AB	8	2,29	0,29	20,05	1,76E-12
Error	45	0,64	0,01		
CV %			6,83		
Media			1,75		

SEPARACION DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN (P < 0,05)

Microorganismos	Media	Rango
M1	2,11	a
M2	1,58	b
M3	1,56	b

Tiempo	Media	Rango
0	4,25	a
24	2,43	b
36	1,45	c
48	0,62	d
72	0,00	e

Inter. AB	Media	Rango
M1B0	4,23	a
M1B24	3,02	b
M1B36	2,21	c
M1B48	1,08	d
M1B72	0,00	f
M2B0	4,23	a
M2B24	2,18	c
M2B36	1,10	d
M2B48	0,40	e
M2B72	0,00	f
M3B0	4,29	a
M3B24	2,10	c
M3B36	1,02	d
M3B48	0,37	e
M3B72	0,00	f

Anexo 2. Análisis de varianza *Salmonella spp.* En la mezcla de cuy con harina de habas.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Microorganismos	Tiempo	Repeticiones		
		I	II	III
M1	0	4,45	4,35	4,36
M1	24	3,18	3,21	3,23
M1	36	1,68	1,65	1,56
M1	48	0,00	0,00	0,00
M1	72	0,00	0,00	0,00
M2	0	4,44	4,35	4,36
M2	24	1,75	1,60	1,81
M2	36	0,00	0,00	0,00
M2	48	0,00	0,00	0,00
M2	72	0,00	0,00	0,00
M3	0	4,44	4,36	4,36
M3	24	1,72	1,70	1,74
M3	36	0,00	0,00	0,00
M3	48	0,00	0,00	0,00
M3	72	0,00	0,00	0,00

ANALISIS DE VARIANZA

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher	P. Fisher
Total	59	137,84			
Microorganismos	2	3,89	1,94	1805,70	1,07E-43
Tiempo	4	128,06	32,01	29724,00	2,36E-76
Lineal	1	108,64	108,64	100865,76	4,81E-77
Cuadrático	1	19,23	19,23	17851,80	3,83E-60
Cúbico	1	0,00	0,00	1,73	1,95E-01
Cuártico	1	0,19	0,19	176,71	0,000
Inter. AB	8	5,84	0,73	678,32	2,94E-44
Error	45	0,05	0,00		
CV %			2,30		
Media			1,43		

SEPARACION DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN (P < 0,05)

Microorganismos	Media	Rango
M1	1,84	a
M2	1,22	b
M3	1,22	b

Tiempo	Media	Rango
0	4,39	a
24	2,22	b
36	0,54	c
48	0,00	d
72	0,00	d

Inter. AB	Media	Rango
M1B0	4,39	a
M1B24	3,21	b
M1B36	1,63	d
M1B48	0,00	e
M1B72	0,00	e
M2B0	4,38	a
M2B24	1,72	c
M2B36	0,00	e
M2B48	0,00	e
M2B72	0,00	e
M3B0	4,39	a
M3B24	1,72	c
M3B36	0,00	e
M3B48	0,00	e
M3B72	0,00	e

Anexo 3. Análisis de varianza *Staphylococcus aureus* en la mezcla de cuy con harina de habas.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Microorganismos	Tiempo	Repeticiones		
		I	II	III
M1	0	4,65	4,72	4,82
M1	24	3,03	3,09	3,13
M1	36	2,53	2,56	2,62
M1	48	1,14	1,16	1,16
M1	72	0,00	0,00	0,00
M2	0	4,66	4,73	4,82
M2	24	2,91	2,98	3,01
M2	36	2,03	1,90	2,01
M2	48	0,80	0,88	0,94
M2	72	0,00	0,00	0,00
M3	0	4,67	4,74	4,83
M3	24	2,95	2,97	3,03
M3	36	2,03	1,90	1,92
M3	48	0,70	0,75	0,80
M3	72	0,00	0,00	0,00

ANALISIS DE VARIANZA

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher	P. Fisher
Total	59	123,13			
Microorganismos	2	0,44	0,22	106,43	8,73E-18
Tiempo	4	122,03	30,51	14750,68	1,64E-69
Lineal	1	120,29	120,29	58164,77	1,14E-71
Cuadrático	1	0,93	0,93	451,76	4,23E-25
Cúbico	1	0,29	0,29	139,74	2,14E-15
Cuártica	1	0,51	0,51	246,46	7,11E-20
Inter. AB	8	0,57	0,07	34,68	9,10E-17
Error	45	0,09	0,00		
CV %			2,10		
Media			2,17		

SEPARACION DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN (P < 0,05)

Microorganismos	Media	Rango
M1	2,31	a
M2	2,11	b
M3	2,09	b

Tiempo	Media	Rango
0	4,74	a
24	3,01	b
36	2,17	c
48	0,93	d
72	0,00	e

Inter. AB	Media	Rango
M1B0	4,73	a
M1B24	3,08	b
M1B36	2,57	c
M1B48	1,15	f
M1B72	0,00	i
M2B0	4,74	a
M2B24	2,97	c
M2B36	1,98	d
M2B48	0,87	g
M2B72	0,00	i
M3B0	4,75	a
M3B24	2,98	c
M3B36	1,95	e
M3B48	0,75	h
M3B72	0,00	i

Anexo 4. Análisis de varianza *Lactobacillus plantarum* antagonismo.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tiempo	Repeticiones		
	I	II	III
0	9,89	9,91	9,95
24	10,80	10,86	10,90
36	11,22	11,28	11,30
48	11,90	11,95	11,98
48	12,56	12,59	12,61

ADEVA

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher	P. Fisher
Total	14	12,56			
Tiempo	4	12,55	3,14	2100,70	0,00
Lineal	1	12,40	12,40	8305,90	0,00
Cuadrática	1	0,02	0,02	15,00	0,00
Cúbica	1	0,07	0,07	48,23	0,00
Cuártica	1	0,05	0,05	33,68	0,00
Error	10	0,01	0,00		
CV %			0,34		
Media			11,31		

SEPARACION DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN

Tiempo	Media	Rango
0	9,92	e
24	10,85	d
36	11,27	c
48	11,94	b
72	12,59	a

Anexo 5. Análisis de varianza *Pediococcus pentosaceus* antagonismo.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tiempo	Repeticiones		
	I	II	III
0	4,96	4,98	4,93
24	5,15	5,18	5,2
36	5,28	5,3	5,32
48	5,42	5,43	5,46
48	5,81	5,85	5,89

ADEVA

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher	P. Fisher
Total	14	1,34			
Tiempo	4	1,33	0,33	450,59	0,00
Lineal	1	1,26	1,26	1698,18	0,00
Cuadrática	1	0,03	0,03	46,33	0,00
Cúbica	1	0,04	0,04	56,50	0,00
Cuártica	1	0,00	0,00	1,36	0,27
Error	10	0,01	0,00		
CV %			0,51		
Media			5,34		

SEPARACION DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN

Tiempo	Media	Rango
0	4,96	e
24	5,18	d
36	5,30	c
48	5,44	b
72	5,85	a

Anexo 6. Análisis de varianza *Lactobacillus*+*Pediococcus* antagonismo.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tiempo	Repeticiones		
	I	II	III
0	9,92	9,95	9,98
24	10,73	10,76	10,78
36	11,52	11,54	11,58
48	11,98	11,99	11,98
72	12,67	12,7	12,71

ADEVA

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher	P. Fisher
Total	14	13,66			
Tiempo	4	13,65	3,41	5816,63	0,00
Lineal	1	13,52	13,52	23046,57	0,00
Cuadrática	1	0,06	0,06	109,16	0,00
Cúbica	1	0,03	0,03	43,01	0,00
Cuártica	1	0,04	0,04	67,79	0,00
Error	10	0,01	0,00		
CV %			0,21		
Media			11,39		

SEPARACION DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN

Tiempo	Media	Rango
0	9,95	e
24	10,76	d
36	11,55	c
48	11,98	b
72	12,69	a

Anexo 7. Antagonismo de los *Lactobacillus* frente patógenos En la mezcla de cuy con harina de habas en función del tiempo (horas).

Estadísticas de la regresión	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella spp</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Coefficiente de correlación múltiple	0,98	0,87	0,82	0,93
Coefficiente de determinación R ²	0,96	0,76	0,68	0,87
Intercepción	9,66	3,57	3,14	3,90
Regresión	0,03	-0,06	-0,06	-0,06
Valor crítico de F	2,17E-10	2,39E-05	1,59E-04	3,37E-07

Anexo 8. Antagonismo de los *Pediococcus pentosaceus* frente a patógenos en la mezcla de cuy harina de habas en función del tiempo (horas).

Estadísticas de la regresión	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella spp</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Coefficiente de correlación múltiple	0,94	0,82	0,81	0,91
Coefficiente de determinación R ²	0,89	0,68	0,65	0,83
Intercepción	4,81	3,01	2,80	4,17
Regresión	0,01	-0,06	-0,05	-0,07
Valor crítico de F	1,15E-07	1,55E-04	2,74E-04	2,14E-06

Anexo 9. Antagonismo de los *Lactobacillus* + *Pediococcus* frente a patógenos en la mezcla de cuy con harina de habas en función del tiempo (horas).

Estadísticas de la regresión	<i>Lactobacillus+ Pediococcus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella spp</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Coefficiente de correlación múltiple	0,99	0,86	0,84	0,93
Coefficiente de determinación R ²	0,97	0,74	0,70	0,87
Intercepción	9,18	3,30	2,86	3,66
Microorganismos	0,04	-0,06	-0,05	-0,06
Valor crítico de F	1,76E-11	3,79E-05	9,35E-05	4,13E-07