



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

*APLICACIÓN EN CARNE DE CERDO DE UN BIOCONSERVANTE EN POLVO OBTENIDO A PARTIR DE *Pediococcus acidilactici**

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E
INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNO/A: Chengjun Han

TUTOR/A ACADEMICO: M^a Jesús Pagán

COTUTOR/A: Ana Teresa Noguerol

Curso Académico: 2019/2020

VALENCIA, 25 de julio, 2020

1. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, se ha observado una preocupación de los consumidores por la calidad de los productos alimenticios que adquieren en las tiendas y los supermercados (Minetti, 2002). Esta situación ha llevado a poner el punto de mira en la conservación de tales alimentos, sobre todo en los productos cárnicos de origen porcino (González et al., 2014).

La carne de cerdo es un alimento muy perecedero y, desde su almacenaje hasta ser consumido, la principal causa de su deterioro son los microorganismos, dado que estos utilizan los nutrientes de la carne generando olores desagradables y modificando el color del producto, entre otras consecuencias (Kemenik, 2013). Bien puede afirmarse que estos productos cárnicos representan un excelente medio para el crecimiento microbiano como bacterias gram-negativas aerobias, inclusive en condiciones de refrigeración (Marcelo et al., 2000).

Ahora bien, los principales microorganismos que deterioran de la carne son las bacterias: (a) *enterobacteriaceae*, (b) *Brochothrix thermosphacta*, (c) bacterias ácido-lácticas (BAL), (d) *Pseudomonas spp.* y (e) aerobios mesófilos (Marcelo, 2007).

Estas bacterias se multiplican fácilmente en la carne fresca gracias a su composición química, su valor de actividad de agua y pH y que, por ende, producen niveles que causan desviaciones sensoriales y tienen como consecuencia la putrefacción de la carne (Doulgeraki et al., 2012). La carga microbiana inicial en el producto cárnico depende del estado fisiológico del animal en el momento del sacrificio y del nivel de contaminación ambiental en el matadero y en las áreas en las que se realiza su manipulación posterior, incluido el nivel de higiene de los empleados, de las herramientas y de los equipos utilizados (Elis et al., 2017). Uno de los posibles métodos para evitar o retrasar la putrefacción de la carne es el uso de la bioconservación (Jessica et al., 2012).

La bioconservación es definida como la extensión de la vida y seguridad de un alimento a través del uso de microbiota natural o controlada y/o sus compuestos antimicrobianos (De la Fuente Salcido et al., 2010). En la bioconservación se incluyen desde técnicas utilizadas para obtener alimentos más seguros hasta la generación de alimentos mínimamente procesados y sin aditivos. Por este motivo, dicho método está teniendo un gran auge basado en el efecto de los llamados bioconservadores que aumentan la vida útil e incrementan la seguridad de los alimentos (Barboza-Corona et al., 2010). Por ejemplo, las bacteriocinas obtenidas a partir de las bacterias ácido lácticas (BAL) pueden ser utilizadas para mejorar la calidad y conservación de los alimentos puesto que son reconocidas como sustancias seguras, no son activas ni tóxicas frente a células eucariotas, son inactivadas por enzimas proteolíticas y, generalmente, estables en amplios intervalos de pH y temperatura (Gálvez et al., 2014). En otras palabras, el éxito de BAL radica

en sus propiedades antibacterianas, atribuidas a los productos finales de su metabolismo como ácido láctico, acético, peróxido de hidrógeno, diacetilo, reuterina y bacteriocinas (Hugas, 1998).

Otro argumento a favor del uso de BAL es su contribución a la reducción y, posterior, inactivación de bacterias Gram negativas, como *Pseudomonas* y enterobacterias (Fariñas et al., 2013). Esto ayuda a reducir la utilización de procesamientos físicos que podrían alterar las propiedades organolépticas de los alimentos (Gálvez et al., 2007). Por lo cual, el uso de estos ácidos orgánicos en la industria de alimentos cumple diversas funciones tecnológicas dependiendo de la aplicación, que se basa en una o varias de las siguientes propiedades, características o atributos (Davidson et al., 2007):

1. poder acidulante
2. propiedad amortiguadora o reguladora del pH
3. agente quelante de iones metálicos
4. emulsificante
5. efectos sensoriales beneficiosos
6. agentes antimicrobianos

De esta forma, con la acidificación y el control del pH en niveles bajos se inhibe o retarda el crecimiento de microorganismos indeseables, especialmente bacterias alterantes y algunas patógenas (Irungaray et al., 2013).

Por todo lo expuesto hasta el momento, el objetivo del presente trabajo consistió en aumentar la vida útil de la carne picada de cerdo mediante el empleo de un bioconservante en polvo obtenido a partir del caldo de fermentación (subproducto) resultante tras el proceso de fermentación de *Pediococcus acidilactici* en un medio de cultivo de grado alimentario y la posterior separación de los microorganismos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Plan de trabajo

El plan de trabajo seguido consistió en dos fases (tabla 1) las cuales se detallan a continuación.

TABLA 1. Plan de trabajo

FASE	DESCRIPCIÓN	METODOLOGÍAS/ DETERMINACIONES
1	Elaboración del bioconservante	<ul style="list-style-type: none"> • Filtración • Liofilización
2	Evaluación de diferentes concentraciones de bioconservante en polvo en carne picada de cerdo	<ol style="list-style-type: none"> 1. Análisis microbiológico 2. pH 3. Color 4. Pérdida de goteo 5. Análisis estadístico

FASE 1. Elaboración del bioconservante en polvo

Inicialmente se procedió a la fermentación de *Pediococcus acidilactici* en un medio de cultivo de grado alimentario. Posteriormente, se separaron los microorganismos mediante filtración y el subproducto conformado por el caldo de fermentación. Este último se liofilizó, lográndose así el objetivo de esta fase: obtener el bioconservante en polvo libre de células para su aplicación en la carne picada de cerdo.

FASE 2. Evaluación de diferentes concentraciones de bioconservante en polvo (30, 40 y 50 g/kg) en carne picada de cerdo.

En esta fase, se testaron diferentes concentraciones (30, 40 y 50 g/kg) de bioconservante en polvo en carne picada de cerdo, junto con un control (0 g/Kg). Las muestras fueron mantenidas en refrigeración durante 9 días. Durante el almacenamiento se analizó la evolución de los siguientes parámetros: crecimiento microbiano, pH, pérdida de agua por goteo y color.

Con todo lo descrito, se alcanzó el objetivo de esta fase: evaluar el efecto del bioconservante en polvo sobre las muestras de carne picada de cerdo.

2.2 Metodología

2.2.1. Elaboración del bioconservante mediante filtración.

El bioconservante se obtuvo a partir de un cultivo iniciador para productos cárnicos crudo-curados, *Pediococcus acidilactici* (Josefa Estelles Mayor, Liria, Valencia). Para ello, se realizó una fermentación de este microorganismo en un caldo de cultivo de calidad alimentaria (29 g/L dextrosa y 31 g/L extracto de levadura) durante 16 horas a 37°C. Una vez obtenido el caldo de fermentación se procedió a su estabilización microbiológica para la obtención del extracto libre de células (CFE).

El método utilizado para la estabilización microbiológica fue la filtración. Primero se llevó a cabo una centrifugación del caldo de fermentación en una centrifuga modelo Centrifuge Modelo 5802R (Eppendorf AG, Alemania),

durante 10 minutos, a 11000 rpm y 4°C. El sobrenadante obtenido se filtró a vacío utilizando una membrana de polietersulfona de 0,22 µm (Membrana Millipore Express PLUS, Merck, Darmstadt, Alemania). A continuación, se adicionó dextrina (Josefa Estellés Mayor S.L., Liria, España) al 10% (p/v) como soporte y, posteriormente, el producto resultante fue sometido a liofilización, utilizando un equipo Telstar LyoAlfa-6 (Telstar, Barcelona, España) durante 48 horas a $0,051 \pm 0,013$ mbar de presión y una temperatura de $-55 \pm 3^\circ\text{C}$.

2.2.2. Evaluación de las concentraciones 30, 40, 50 g/Kg, en carne picada de cerdo.

2.2.2.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

La carne de cerdo que había sido comprada en un mercado local, se picó en condiciones asépticas mediante una picadora Modelo DP700 (Moulinex, Alençon, Francia). Se separó en porciones de 25 g a las que se añadió el bioconservante a diferentes concentraciones 30 g, 40 g y 50 g por kg de carne. Asimismo, se preparó una muestra control, compuesta por carne picada sin la incorporación de bioconservante (0 g/kg). A continuación, las muestras se almacenaron a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ en bandejas de plástico durante 9 días, y se realizó el muestreo a los 0, 2, 4, 7 y 9 días de almacenamiento.

2.2.2.2. DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS

Para la realización de las determinaciones microbiológicas primero se homogeneizaron las muestras con un Stomacher LAB Blender 400 (Pbi International, Milán, Italia) y a continuación se realizaron diluciones decimales seriadas con agua peptonada (Scharlau, Chemie, S.A., Barcelona, España). Las determinaciones microbiológicas realizadas fueron: aerobios mesófilos (UNE-EN ISO 4833/2003) en Plate Count Agar (PCA) (Scharlau, Chemie, S.A., Barcelona, España) incubando a 30°C durante 48-72 h; bacterias ácido lácticas (ISO 15214/1998) en agar De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (Scharlau, Chemie, S.A., Barcelona, España) incubando a 37°C durante 48-72 h; *Enterobacteriaceae* (ISO 21528-2/2004) en agar Violeta Rojo Bilis Dextrosa (VRBD) (Scharlau, Chemie, S.A., Barcelona, España) incubando a 37°C durante 24 h; *Brochothrix thermosphacta* en agar de sulfato de estreptomina, acetato de sodio y actidiona (STAA) (Oxoid, Oxoid Ltd. Basingstoke, Hampshire, Inglaterra), incubando a 25°C durante 48 h (Cayré et al., 2005); y *Pseudomonas spp.*, en agar *Pseudomonas* (Scharlau, Chemie, S.A., Barcelona, España) incubado a 25°C durante 48 h (Katikou et al., 2005).

Para determinar el efecto de las diferentes dosis de bioconservante sobre los microorganismos estudiados, se realizaron modelizaciones empleando el programa DMFit 2.0, en su versión online, escogiendo el modelo matemático que más se ajustaba a cada caso y obteniéndose a partir de este los parámetros característicos del crecimiento microbiano: μ_{max} (velocidad máxima de crecimiento de crecimiento), λ (tiempo de latencia), y_0 (número

inicial de células y MDP (máxima densidad poblacional).

2.2.2.3. DETERMINACIONES FISICOQUÍMICAS

2.2.2.3.1. Pérdida de agua por goteo

La pérdida de agua por goteo o Drip Loss (DL) se determinó mediante el método gravimétrico descrito por Honikel (1997) que consiste en colocar la muestra de carne (25 g) en una red que la envuelva. Posteriormente, la muestra se suspende en el interior de un recipiente con tapa, separando así la masa cárnica del agua que se pierde por goteo. Los recipientes con las muestras se almacenaron en refrigeración a 4°C durante 9 días, realizándose mediciones de peso en una balanza Sartorius i1800 (Sartorius GMBH, Göttingen, Alemania) con una precisión de $\pm 0,1$ mg a los 0, 2, 4, 7 y 9 días. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. Se calculó la pérdida de agua (expresada como % agua exudada por gramo de carne) según la ecuación (1).

$$\% \text{ agua perdida} = \frac{(M_0 - M_t)}{M_0} \times 100 \quad (1)$$

Donde:

M_0 = peso de la muestra a tiempo 0

M_t = peso de la muestra a los distintos tiempos analizados

2.2.2.3.2. Evolución del pH

Para la determinación del pH se utilizó un pH-metro de punción BASIC 20+ (Crison Instruments, S. A., Barcelona, España) utilizando un electrodo de punción. Las medidas para cada muestra se realizaron por duplicado.

2.2.2.3.3. Evolución del color

El color se evaluó en la superficie de las muestras. Las medidas de color, coordenadas L^* , a^* y b^* del espacio CIE $L^*a^*b^*$ se obtuvieron mediante un colorímetro Konica Minolta CM-700d/600d (Minolta Camera Co., Osaka, Japón) provista con máscara de 8 mm. Los datos fueron registrados utilizando el Software SpectraMagic (Minolta Camera Co., Osaka, Japón). Se realizaron entre 6 y 8 medidas para cada muestra. La diferencia de color total (ΔE) fue calculada mediante la siguiente ecuación (2):

$$\Delta E = [(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2]^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

Dónde:

L^* = luminosidad de la muestra

a^* = valores de rojo/verde

b^* = valores de amarillo/azul

L^* , a^* y b^* = valores de luminosidad, rojo/verde y amarillo/azul, respectivamente de la muestra patrón

Todas las determinaciones fisicoquímicas se realizaron a los 0, 2, 4, 7 y 9 días de almacenamiento.

2.3. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos se realizó empleando el programa Statgraphics Centurion XV versión 15.2.06 (Manugistics. Corp., Rockville, EE.UU.) con un nivel de confianza de 95%. Para evaluar la significación de los factores y sus interacciones se realizaron ANOVAs, cuando estos resultaron significativos se analizaron las diferencias entre los distintos niveles mediante Pruebas de Múltiple Rangos utilizando el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) para discriminar entre las medias.

Para analizar las diferencias existentes entre los parámetros característicos del crecimiento microbiano obtenido a partir de las modelizaciones de los datos experimentales, se utilizó el criterio dos sigma. Este define el intervalo de confianza en el que se encuentra el 95% de la población analizada (Carot, 2012; Barón y Téllez, 2004).

3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS

La evolución de la microbiota durante el almacenamiento de las muestras de carne picada, con y sin bioconservante, se analizó modelizando el comportamiento de los diferentes grupos microbianos (aerobios mesófilos, bacterias ácido lácticas, *Pseudomonas spp.*, *Brochothrix thermosphacta* y enterobacterias). A partir de dichas curvas, se obtuvieron los parámetros característicos del crecimiento microbiano.

En la figura 1 se muestra la evolución de aerobios mesofilos y en la tabla 1 los parámetros obtenidos a partir de dichas modelizaciones.

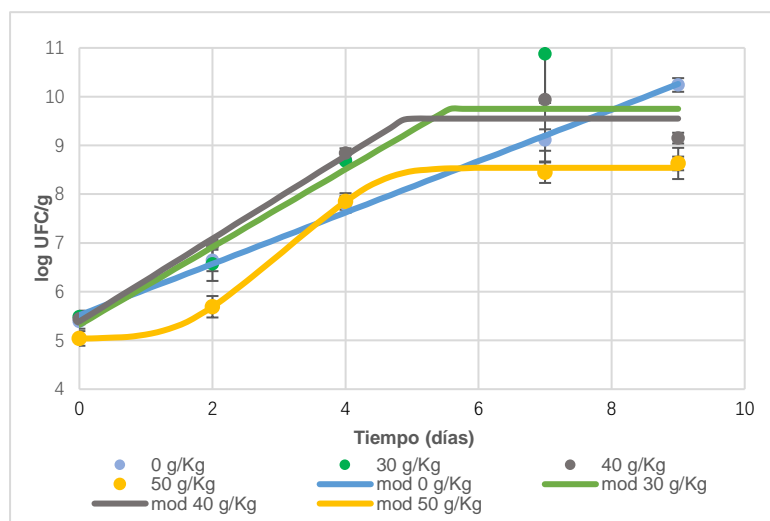


FIGURA 1. Curvas de crecimiento modelizadas para las diferentes concentraciones de bioconservante a partir de los recuentos obtenidos de aerobios mesófilos.

TABLA 1. Parámetros de crecimiento obtenidos a partir de las modelizaciones para aerobios mesófilos.

Concentración	Modelo	μ_{max}	λ	y_0	MDP	R^2	SE
0 g/Kg	Lineal	0,527±0,019	-	5,516±0,104	-	0,995	0,139
F 30 g/Kg	Biphasic (no lag)	0,798±0,411	-	5,318±1,062	-	0,690	1,164
F 40 g/Kg	Biphasic (no lag)	0,850±0,143	-	5,387±0,370	-	0,951	0,406
F 50 g/Kg	Baranyi	1,149±0,110	1,509±0,226	5,040±0,127	8,540±0,090	0,994	0,127

μ_{max} : velocidad máxima de crecimiento de crecimiento [(log ufc /g)h⁻¹]

λ : tiempo de latencia (días)

y_0 : Número inicial de células (unidades logarítmicas)

MDP: Número final de células (unidades logarítmicas)

La evolución de los recuentos de aerobios mesófilos de la muestra control (sin adición de bioconservante) exhibieron una tendencia lineal comparándose con las muestras con diferentes dosis de bioconservante. En el caso del control se alcanzaron recuentos de 10,26 log ufc/g al noveno día de almacenamiento con una velocidad constante de crecimiento de 0,527 log ufc/g.h⁻¹. Las concentraciones 30 y 40 g de bioconservante por kg de carne mostraron una evolución de los microorganismos aerobios mesofilos según el modelo bifásico sin fase de latencia.

Cuando la concentración utilizada fue de 50 g/kg el comportamiento de los microorganismos aerobios mesofilos siguió un comportamiento distinto. Se

detectó una fase de latencia de 1,5 días lo que indica que durante dicho periodo no hubo crecimiento de este grupo de microorganismos. Por lo tanto, la adición de bioconservante a dicha concentración permitiría inhibir el desarrollo de aerobios mesófilos en el primer día de almacenamiento en refrigeración. Entre los días 2 y 4, es cuando se observó el mayor crecimiento con una velocidad de $1,149 \text{ (log ufc/g).h}^{-1}$. Este se estabilizó a partir del día 5 con una máxima densidad poblacional de $8,5 \text{ log ufc/g}$.

Por lo tanto, la utilización de bioconservante a dosis 30 y 40 g/kg permitió estabilizar el crecimiento de los aerobios mesofilos. La dosis de 50 g/kg no solo estabilizó su crecimiento lográndose una reducción de aproximadamente 1 log ufc/g al final del almacenamiento, respecto a las muestras sin conservantes o con dosis inferiores, sino que además inhibió el desarrollo de estos microorganismos durante el primer día y medio.

Según el REGLAMENTO (CE) N° 2073/2005 modificado por el reglamento CE 1441/2007, en el caso de la carne picada a base de carne de especies distintas a las aves de corral y destinada a ser consumida cocinada, los máximos de aerobios mesofilos deben ser del orden de $5 \cdot 10^6 \text{ ufc/g}$.

En este trabajo dicho valor se alcanzó al cabo de aproximadamente 1.5 días para todas las muestras excepto cuando la dosis de bioconservante utilizada fue de 50 g/kg doblándose el tiempo de vida útil de 1,5 días a 3 días. Por lo tanto, se observa un claro efecto antimicrobiano para los aerobios mesófilos con la concentración de 50 g/Kg de bioconservante, ya que esta disminuyó la velocidad máxima de crecimiento con respecto de la muestra control, se retrasó el desarrollo de estos microorganismos 1.5 días y los recuentos a los 9 días de almacenamiento fueron aproximadamente 2 log ufc inferiores a los detectados para la muestra control.

La evolución de las enterobacterias presentes en las muestras analizadas se puede observar en la figura 2, y los parámetros de crecimiento obtenidos a partir de la modelización de los datos experimentales en la tabla 2.

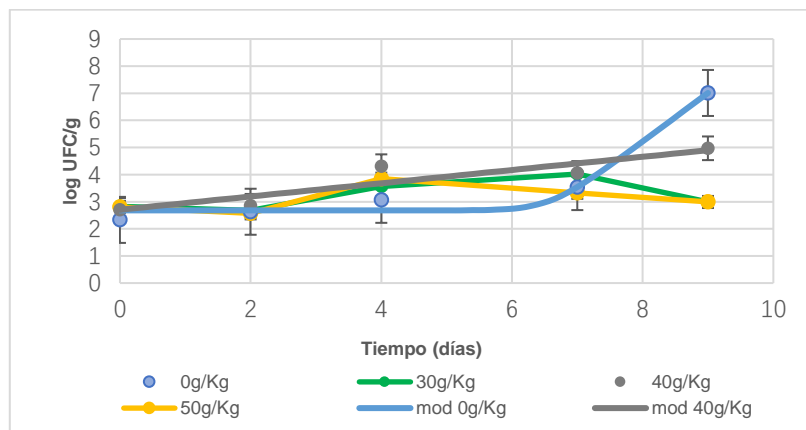


FIGURA 2. Curvas de crecimiento modelizadas para las diferentes concentraciones de bioconservante obtenidas a partir de los recuentos de enterobacterias.

TABLA 2. Parámetros de los modelos de crecimiento para enterobacterias a concentraciones de bioconservante de 0, 30, 40 ,50g/kg de carne de cerdo

Concentración	Modelo	μ_{max}	λ	y_0	MDP	R²	SE
0 g/Kg	Baranyi (no asymptote)	1,790±0,297	6,579±0,351	2,677±0,215	-	0,962	0,372
F 30 g/Kg	No modelo	-	-	-	-	-	-
F 40 g/Kg	Lineal	0,244±0,063	-	2,705±0,348	-	0,775	0,463
F 50 g/Kg	No modelo	-	-	-	-	-	-

μ_{max} : velocidad máxima de crecimiento de crecimiento [(log ufc /g)h⁻¹]

λ : tiempo de latencia (días)

y_0 : Número inicial de células (unidades logarítmicas)

MDP: Número final de células (unidades logarítmicas)

Para este grupo de microorganismos no se pudo modelizar el comportamiento en el caso de las dosis de 30 y 50 g/Kg de bioconservante. En el caso del control el comportamiento de las enterobacterias siguió el modelo de Baranyi y Roberts sin fase asintótica, con una fase de latencia de 6,6 días y una velocidad máxima de crecimiento de 1,790 (log ufc /g)h⁻¹ (tabla 2). En cuanto a la concentración 40 g/Kg de bioconservante, se observó un comportamiento lineal durante los 9 días de muestreo, con una menor velocidad máxima de crecimiento de 0,244 (log ufc /g)h⁻¹. Las concentraciones 30 y 50 g/Kg de bioconservante mostraron el último día de muestreo un recuento de aproximadamente 4 log ufc/g por debajo de la muestra control, siendo este dato destacable (figura 2).

Según la figura 2, a pesar de que las muestras sin antimicrobiano presentaron una fase de latencia larga, a partir del día 6, los recuentos de enterobacterias aumentaron de manera espectacular hasta valores de 7,01 log ufc/g a los 9 días de almacenamiento. Por otra parte, las muestras con dosis de 40 g/kg de antimicrobiano presentaron unos recuentos finales 4,9 log ufc/g, lo que indica una reducción de 1,4 log de ufc respecto al control. En el caso de las muestras con 30 y 50 g/kg de bioconservante no se identificó una evolución clara, pero con la dosis de 50 g/kg se observaron recuentos iguales o inferiores a los detectados para el resto de las muestras analizadas a partir de séptimo día de almacenamiento. El día 9 estos fueron 2.99 log ufc/g lo que indica una reducción de 4 log ufc/g respecto al control.

En el REGLAMENTO (CE) N° 2073/2005 modificado por el reglamento CE 1441/2007, en el caso de la carne picada a base de carne de especies distintas a las aves de corral y destinada a ser consumida cocinada, no se indican niveles máximos permitidos de enterobacterias. Pero en otra norma referente a carnes refrigeradas y congeladas se estable un límite de 10² ufc/g.

Por lo tanto, la muestra con 50 g/kg de bioconservante sería la que más garantizaría este criterio.

La figura 3 y la tabla 3 muestran la evolución de la flora láctica y los parámetros de crecimiento asociados a su modelización, respectivamente.

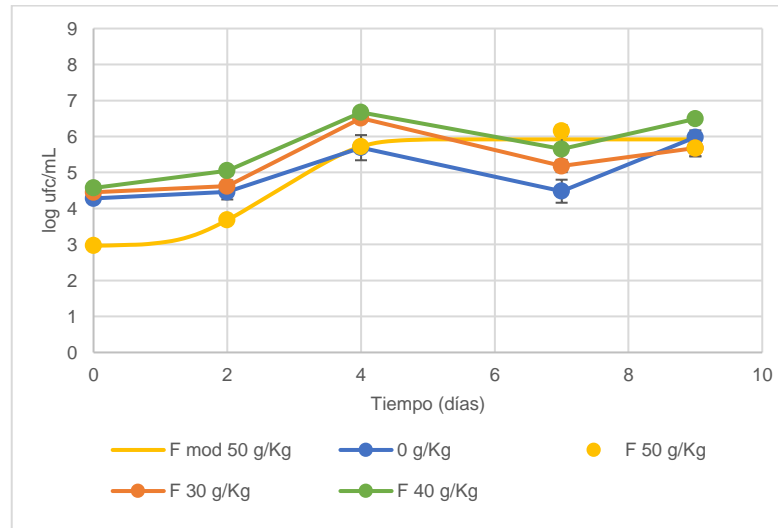


FIGURA 3. Curvas de crecimiento modelizadas a los diferentes tiempos y concentraciones de bioconservante a partir de los recuentos obtenidos de bacterias ácido lácticas.

TABLA 3. Parámetros de los modelos de crecimiento para bacterias ácido-lácticas a concentraciones de bioconservante de 0, 30, 40, 50g/kg de carne de cerdo.

Concentración	Modelo	μ_{max}	λ	y_0	MDP	R^2	SE
0 g/Kg	No modelo	-	-	-	-	-	-
F 30 g/Kg	No modelo	-	-	-	-	-	-
F 40 g/Kg	No modelo	-	-	-	-	-	-
F 50 g/Kg	Baranyi	1,150±0,414	1,427±0,588	2,970±0,339	5,920±0,240	0,943	0,339

μ_{max} : velocidad máxima de crecimiento de crecimiento [(log ufc /g)h⁻¹]

λ : tiempo de latencia (días)

y_0 : Número inicial de células (unidades logarítmicas)

MDP: Número final de células (unidades logarítmicas)

Las bacterias ácido lácticas por su parte, se comportaron de manera similar a la muestra control. Aunque cabe destacar, que con la concentración 50 g/Kg de aditivo se observó un descenso poblacional nada más incorporarlos (ver figura 3). Además, en esta concentración, como se muestra en la tabla 3, se

observó una fase de latencia, de 1,4 días. La muestra control, y las concentraciones 30, y 40 g/Kg de bioconservante estabilizado mediante filtración no se ajustaron a ningún modelo de los utilizados.

Las bacterias del ácido láctico, a pesar de que no producen toxinas, producen ácido láctico, lo que reduce el valor del pH y reduciendo el crecimiento de otros tipos de bacterias. Al mismo tiempo, debido a que el CO₂ se disuelve en la carne, se inhibe el crecimiento de bacterias distintas de las bacterias distintas a las lácticas. Además, al descomponer la proteína lentamente, hace que la carne produzca un aroma ácido, que es similar al queso durante el proceso de deterioro de carne (Norma Heredia et al., 2014).

La figura 4 y la tabla 4 muestran la evolución de la *Brochothrix thermosphacta* y los parámetros de crecimiento asociados a su modelización, respectivamente.

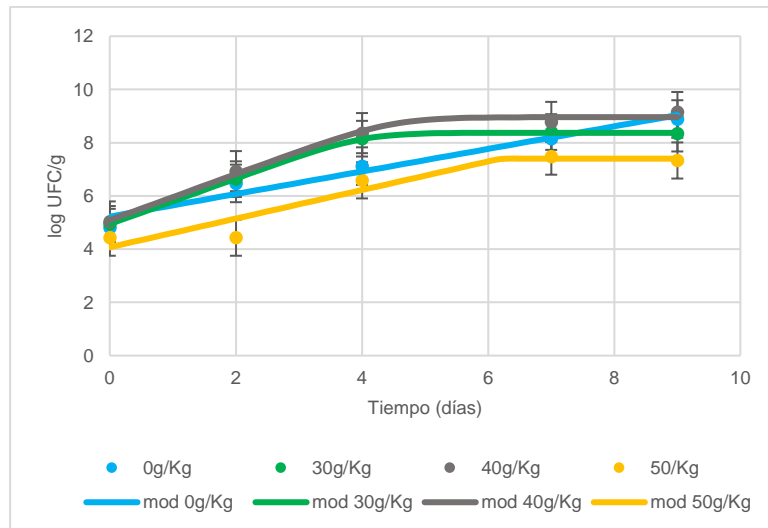


FIGURA 4. Curvas de crecimiento modelizadas a los diferentes tiempos y concentraciones de bioconservante a partir de los recuentos obtenidos de *Brochothrix thermosphacta*.

TABLA 4. Parámetros de los modelos de crecimiento para *Brochothrix thermosphacta* a concentraciones de bioconservante de 0, 30, 40 ,50g/kg de carne de cerdo.

Concentración	Modelo	μ_{max}	λ	y_0	MDP	R^2	SE
0 g/Kg	Lineal	0,424±0,049	-	5,223±0,272	-	0,947	0,362
F 30 g/Kg	Baranyi	0,887±0,053	0,105±0,148	4,950±0,042	8,370±0,030	0,999	0,042
F 40 g/Kg	Baranyi (no lag)	0,864±0,089	-	5,092±0,197	8,959±0,149	0,984	0,210
F 50 g/Kg	Biphasic (no lag)	0.537 ± 0.221	-	4.0717 ± 0.57	-	0.83	0.625

μ_{max} : velocidad máxima de crecimiento de crecimiento [(log ufc /g)h⁻¹]

λ : tiempo de latencia (días)

y_0 : Número inicial de células (unidades logarítmicas)

MDP: Número final de células (unidades logarítmicas)

Durante el almacenamiento se altera la composición de la microbiota dominante. *Brochothrix thermosphacta* es una de ellas, es un tipo de bacteria psicrótrófico de la superficie de carnes y no provienen del intestino (Mossel et al. 2003).

B. thermosphacta es uno de los principales microorganismos que determinan la calidad de las carnes, siendo uno de los microorganismos responsable del deterioro de los productos cárnicos. Se ha encontrado como microorganismo dominante en carne almacenada en atmósfera modificada (80% O₂, 20% CO₂) y constituye, junto con las bacterias ácido lácticas (BAL), la microbiota predominante en productos cárnicos envasados al vacío (Leonardo, 2013). En lo que respecta a este microorganismo los menores recuentos se dieron con dosis de 50 g/kg de bioconservante.

La figura 5 y la tabla 5 muestran la evolución de *Pseudomonas spp.* y los parámetros de crecimiento asociados a su modelización, respectivamente.

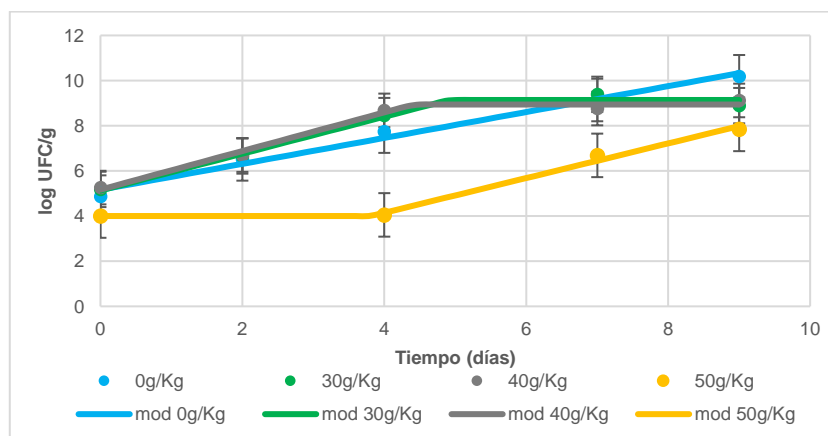


FIGURA 5. Curvas de crecimiento modelizadas a los diferentes tiempos y concentraciones de bioconservante a partir de los recuentos obtenidos de *Pseudomonas spp.*

TABLA 5. Parámetros de los modelos de crecimiento para *Pseudomonas spp.* a concentraciones de bioconservante de 0, 30, 40 ,50g/kg de carne de cerdo.

Concentración	Modelo	μ_{max}	λ	y_0	MDP	R^2	SE
0 g/Kg	Lineal	0,574±0,038	-	5,163±0,209	-	0,983	0,278
F 30 g/Kg	Biphasic (no lag)	0,817±0,094	-	5,128±0,242	-	0,977	0,266
F 40 g/Kg	Biphasic (no lag)	0,855±0,084	-	5,170±0,217	-	0,979	0,238
F 50 g/Kg	Biphasic (no lag)	0.768 ± 0.0834	3.809 ± 0.544	4 ± 0.297	-	0.976	0.297

μ_{max} : velocidad máxima de crecimiento de crecimiento [(log ufc /g)h⁻¹]

λ : tiempo de latencia (días)

y_0 : Número inicial de células (unidades logarítmicas)

MDP: Número final de células (unidades logarítmicas)

La evolución de la carga microbiana de *Pseudomonas* se testó también en la muestra control, y en las concentraciones 30, 40 y 50 g/Kg de bioconservante estabilizado por filtración, esta evolución se muestra en la figura 5, y los parámetros de crecimiento en la tabla 5. Al igual que para aerobios mesófilos y *Brochothrix thermosphacta* la muestra control mostró un comportamiento lineal durante los 9 días de muestreo. En las muestras con 30 y 40 g/kg de bioconservante se observó una velocidad de crecimiento superior a la observada para el control. Posteriormente los recuentos se estabilizaron entorno al quinto día de almacenamiento. Al final del almacenamiento los recuentos observados fueron 1,4 log ufc inferiores a los de la muestra control. Cuando se utilizó el bioconservante a dosis de 50 g/kg se observó un claro efecto antimicrobiano con una fase de latencia de aproximadamente 4 días, y unos recuentos finales por debajo de los observados para el resto de las muestras.

Cabe mencionar que el desarrollo de *Pseudomonas* es particularmente evidente en el caso de la carne almacenada bajo condiciones aeróbicas donde son los principales microorganismos causantes de deterioro, producen sulfuros, ésteres y aminas (Casaburi et al., 2014).

Los resultados obtenidos indican actividad antimicrobiana fundamentalmente cuando las dosis utilizadas son de 50 g/kg y frente a *Pseudomonas spp.*, *Brochothrix thermosphacta*, enterobacterias y aerobios mesófilos.

3.2 DETERMINACION FISICOQUÍMICAS

3.2.1. pH de las muestras

En la figura 6 se muestra la evolución del pH en la carne picada de cerdo durante los 9 días de almacenamiento. En este periodo de estudio, se observó

que la concentración 50 g/Kg de aditivo estabilizado mediante filtración mantuvo el pH estable hasta el día 4, y a partir de este día se produjo una disminución. Para las muestras 30 y 40 g/Kg el pH se mantuvo estable hasta el día 2, a partir del cual los valores de pH sufrieron un leve descenso. En el caso de la muestra control, se observó un incremento de pH a partir del día 4, probablemente debido al desarrollo de flora proteolítica alterante.

En el análisis estadístico realizado no se observaron diferencias significativas en el primer día de estudio entre las muestras control, 30 y 40 g/Kg de bioconservante. Si se encontraron diferencias entre la muestra control y la concentración 50 g/Kg, siendo el pH de este más bajo desde la incorporación del producto liofilizado. En el día 9 del estudio, se detectaron diferencias significativas entre la muestra control y todas las concentraciones de aditivos testadas, no encontrándose diferencias entre estas.

A la vista de estos resultados podría existir una relación entre la evolución del pH y la actividad antimicrobiana detectada para las diferentes concentraciones de bioconservante. Pero, aunque no se observan grandes diferencias en los valores de pH entre las distintas concentraciones estudiadas sí que estas son evidentes en su actividad antimicrobiana.

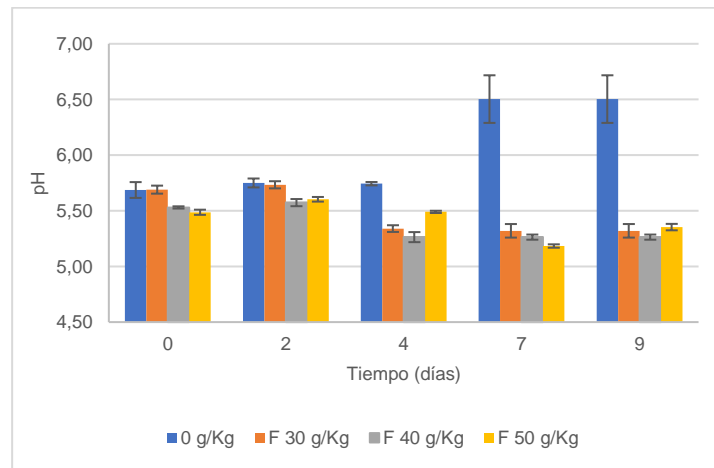


FIGURA 6. Evolución del pH durante en las muestras de carne picada de cerdo tratadas con diferentes dosis de aditivos.

3.2.2. Pérdida de agua por goteo de las muestras

El resultado del análisis de la pérdida de agua por goteo se muestra en la figura 7. Se observó que la que más agua perdió fue la muestra control, y seguidamente la concentración 30 g/Kg de bioconservante. En cuanto a la concentración 40 g/Kg se observó que fue perdiendo agua durante los 9 días de almacenamiento, pero esta fue la que menos porcentaje de agua perdió. Por último, la muestra 50 g/Kg se mantuvo hasta el día 7 con el mismo porcentaje de agua perdida, pero entre el día 7 y el 9 perdió un 7,7% de agua exudada por gramo de carne.

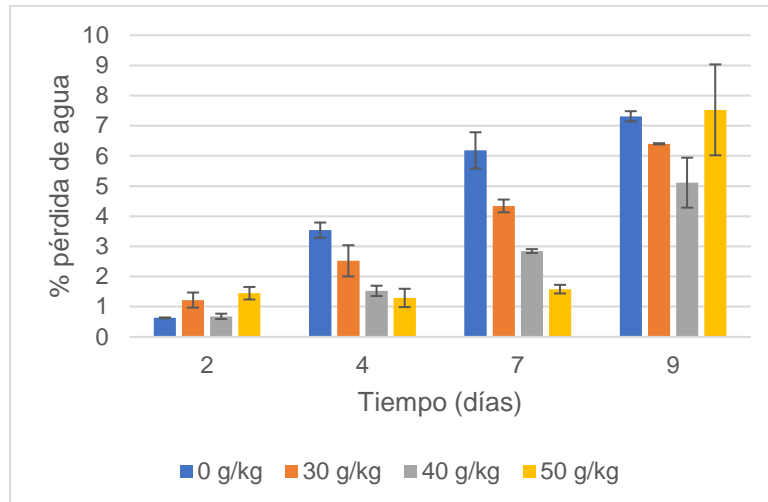


FIGURA 7. Pérdida de agua por goteo en las muestras de carne picada de cerdo tratadas con diferentes concentraciones.

3.2.3 Color de las muestras

En la figura 8 se muestran los cambios producidos en las coordenadas L^* , a^* y b^* de la carne al incorporar el bioconservante testado en diferentes concentraciones, y en la Figura 10 se observan las diferencias de color con respecto a la muestra 0 g/Kg en cada uno de los días de estudio.

En las muestras con una concentración de 50 g/Kg, se apreció como el parámetro L^* se mantuvo estable hasta el día 4, en este momento se observó un ligero aumento en sus valores. Los valores de L^* en muestra control y la concentración 40 g/Kg se mantuvieron estables durante todo el estudio. Y, en el caso de la concentración 30 g/Kg, se produjo un descenso del valor de L^* a partir del día 7. Según el análisis estadístico se encontraron diferencias significativas entre la muestra 50 g/Kg y la muestra control, durante todo el periodo de estudio. No se encontraron diferencias el primer día de estudio entre la muestra control y las muestra 30 y 40 g/Kg de bioconservante, pero si se encontraron diferencias el último día de estudio entre la muestra control y la concentración 30 g/Kg.

En cuanto a la coordenada a^* , referida al color rojo, se apreció que todas las concentraciones probadas mantuvieron este valor estable durante el periodo de estudio, excepto en la muestra control en la que disminuyó a partir del día 7. No se observaron diferencias significativas el primer día de estudio entre la muestra control y las concentraciones 30 y 40 g/Kg de aditivo, pero si se encontraron diferencias con la muestra 50 g/Kg con respecto al control. Se observó como en el último día de estudio había diferencias significativas entre todas las concentraciones testadas con respecto a la muestra control, quedando esta con valores más bajos.

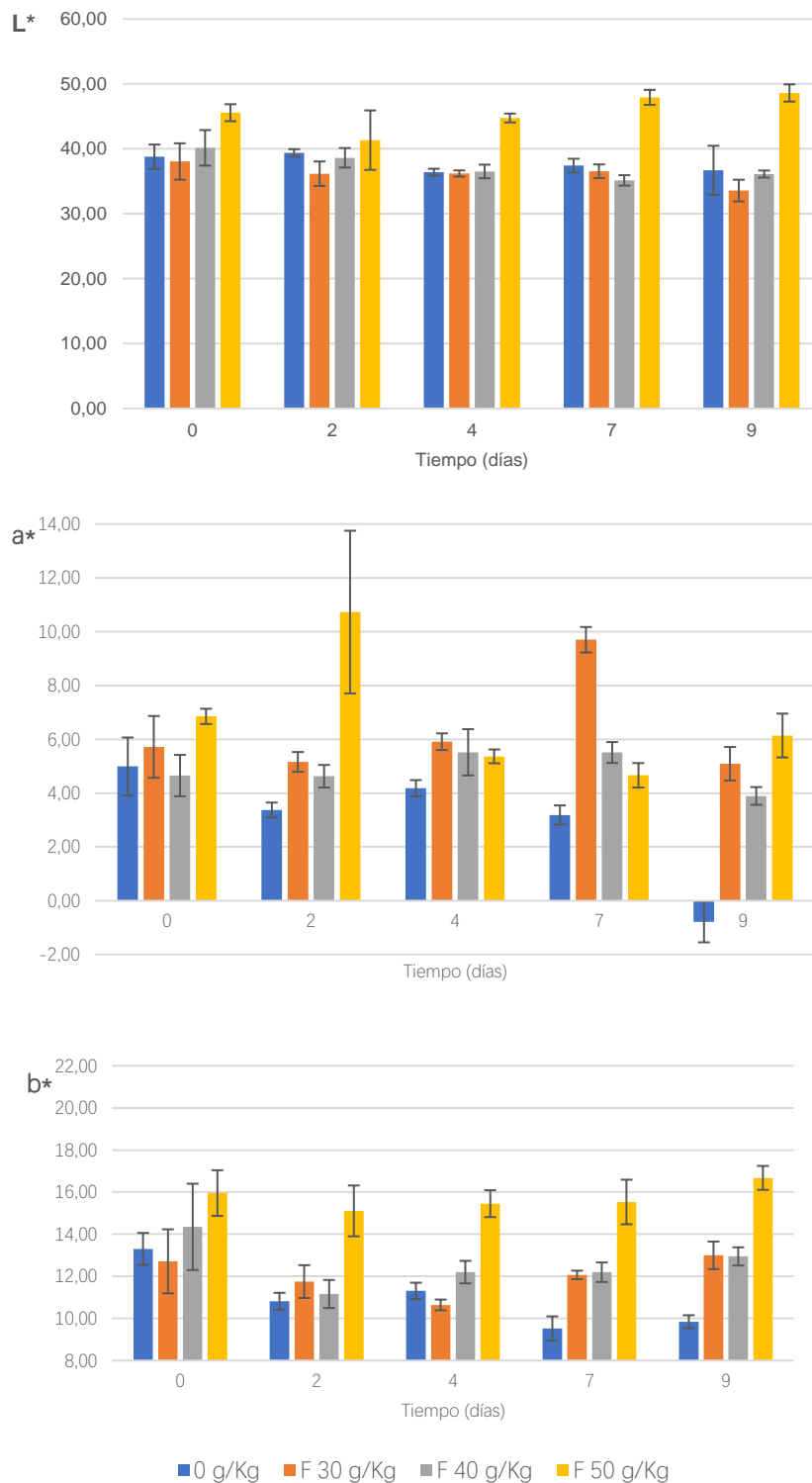


FIGURA 9. Coordenadas L*, a* y b* de las muestras de carne picada de cerdo tratadas con diferentes concentraciones de los aditivos probados.

Por otro lado, la coordenada b*, referida al color amarillo, se mantuvo estable en la concentración 50 g/Kg con un ligero aumento el último día. Para la

muestra control y la muestra 40 g/Kg se observó un descenso a partir del primer día de estudio. La concentración 30 g/Kg se mantuvo estable durante todos los días de estudio. El primer día de estudio se encontraron diferencias significativas entre la muestra 50 g/Kg y la muestra control, no encontrándose diferencias entre la muestra control y las concentraciones 30 y 40 g/Kg testadas. Al final del estudio se apreciaron diferencias significativas entre todas las concentraciones testadas y la muestra control, siendo los valores de esta son menores.

En lo que respecta a la diferencia de color entre las muestras con bioconservante y el control si se observó un efecto relevante de la incorporación de los antimicrobianos, en el caso de la concentración más alta (50 g/Kg), ya que estas muestran una diferencia de color muy evidente como se muestra en la Figura 10.

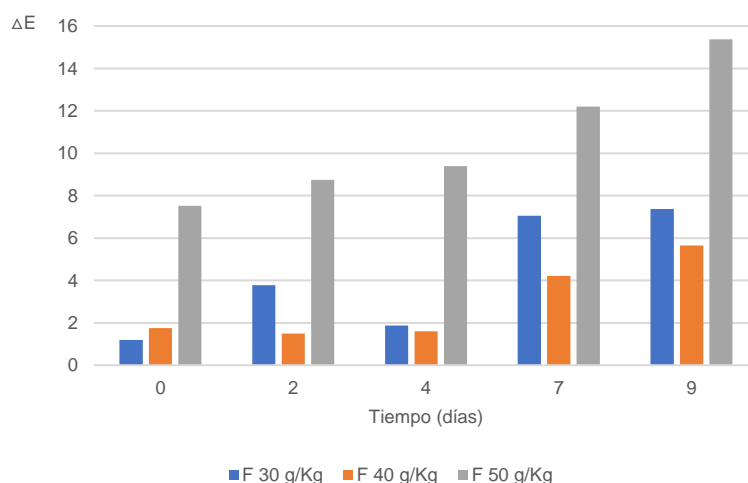


FIGURA 10. Cambios de color con respecto a la muestra 0 g/Kg en cada uno de los días de estudio.

4. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos indican actividad antimicrobiana cuando las dosis utilizadas son de 50g/kg y frente a *Pseudomonas spp.*, *Brochothrix thermosphacta*, enterobacterias y aerobios mesofilos.
- Dosis de 30 y 40 g/kg de bioconservante no presentan efecto antimicrobiano claro.
- La incorporación de bioconservante apenas modifica el valor del pH de la carne, solo se observa un ligero descenso lo que contrasta con el elevado incremento de este en las muestras control.
- La capacidad de retención de agua no se modificó como consecuencia de adicionar los aditivos.

- La adición de estas concentraciones de aditivo no produjo un efecto significativo sobre el color de la carne, puesto que no se observaron diferencias relevantes en las coordenadas L*, a* y b*. En el caso de la concentración más alta (50 g/Kg), si se observaron diferencias evidentes con respecto a la muestra control.

Bibliografía

- Barboza-Corona, J.E. *et al.* (2009). "Activity of Bacteriocins Synthesized by *Bacillus Thuringiensis* Against *Staphylococcus Aureus* Isolates Associated to Bovine Mastitis" en *Veterinary Microbiology*, p. 179-183.
- Baron, F. J. y Téllez, F. (2004). "Apuntes de bioestadística: Tercer ciclo en Ciencias de la Salud y Medicina", [en línea]. Universidad de Málaga. (2012). Dirección URL: <<http://www.bioestadistica.uma.es/baron/>>. [Consulta: 14 de junio 2019].
- Carot, J. M. *et al.* (2012). "Biomarcadores de imagen, imagen cuantitativa y bioingeniería" en *ScienceDirect*, vol. 54, issue 3, Pages 269-278.
- Casaburi, Lorenzo y Michael Kremer. (2014). "Harnessing ICT to Increase Agricultural Production: Evidence From Kenya **"
<https://www.atai-research.org/wp-content/uploads/2017/03/Harnessing-ICT-to-Increase-Agric-Production_Casaburi-et-al._Sept2019.pdf> [Consulta: 18 de junio 2019].
- Cayré, M.E., Garro, O. y Vignolo, G. (2005). "Effect of Storage Temperature and Gas Permeability of Packaging Film on the Growth of Lactic Acid Bacteria and *Brochothrix Thermosphacta* in Cooked Meat Emulsions" en *ScienceDirect*, vol 22, issue 6, p. 505-512.
- CENAN. (1982). *Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos y bebidas del Centro Nacional de Alimentación y Nutrición*. Ministerio de Sanidad y Consumo. Instituto Nacional de Sanidad. España, p. 221-224.
- Davidson, P., Taylor, T. y Schmidt S. (2013). "Chemical Preservatives and Natural Antimicrobial Compounds", Washington, D.C.: en *Doyle M, Buchanan R (ed), Food Microbiology*. P. 765-801.
- De la Fuente Salcido, N.M. y Corona, J.E.B. (2010). "Inocuidad y bioconservación de Alimentos" en *Acta Universitaria*, vol. 20, issue 1, p. 43-52.
- Doulgeraki, Al, *et al.* (2012). "Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions" en *Int J Food Microbiol*, vol. 157, issue2, p.130-141.
- Elis Caroline Celestina dos Santos, *et al.* (2017). "Evaluation of the sanitary Conditions of Hear Meat, Esophagus, Diaphragm Meat, and Boning Scrap Processing" en *Journal of Food Quality*. Volume 2017, p. 2-4.
- Francis, F.J. y Clydesdale, F.M. (1975) *Food Colorimetry: Theory and Applications*. vol. 21, issue 1, p. 90–91.
- Fariñas, M.C. y Martínez-Martínez, L. (2013). "Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica" en *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 31, issue 6, p. 402-407.
- Gálvez, A. *et al.* (2007). "Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. International journal of food microbiology" en *International Journal of food microbiology*, p. 51-70.
- Gálvez, A. *et al.* (2014). "Natural Antimicrobials for Food Biopreservation" en *Food Biopreservation*, Gálvez Antonio, Rosario Lucas López y Rubén Pérez Pulido, New York, pp. 3-14.
- González Martínez *et al.* (2014). *El consumo de Alimentos Ecológicos en España. Marketing y Publicidad*. Trabajo fin de grado. Sevilla: Universidad de Sevilla.
- Honikel, Karl Otto. (1997). "Reference Methods Supported by OECD and Their Use in

- Mediterranean Meat Products.” en *Food Chemistry*, vol 59, issue 4, p. 573-582.
- Huang Yu-feng et al., (2013). Detection and enumeration of enterobacteriaceae in meat and meat products. China, p.1-2.
<https://www.researchgate.net/publication/295553475_Detection_and_enumeration_of_enterobacteriaceae_in_meat_and_meat_products> [Consulta: 20 de junio 2019].
- Hugas, M. (1998). “Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria for the Biopreservation of Meat and Meat Products.” En *Meat Science*, Hugas M., Monells, España, vol. 9, sección 1, p. 39-50.
- Inungaray Cariillo y Reyes, A. (2013). *Vida útil de los alimentos*. Tesis. San Luis, S.L.P.: Universidad de San Luis Potosí.
- Jessica Aguilar Morales, (2012). “Cómo conservar alimentos frescos” en *Métodos de Conservación de Alimentos*. Jessica Aguilar Morales. Viveros de la loma, p. 27-29.
- Katikou, P. et al. (2005). “Effect of Lactobacillus-Protective Cultures with Bacteriocin-like Inhibitory Substances’ Producing Ability on Microbiological, Chemical and Sensory Changes during Storage of Refrigerated Vacuum-Packaged Sliced Pork” en *Journal of applied microbiology*, vol. 99, issue 6, p.1303–1313.
- Marcelo, O. Masana y József Baranyi. (2000). “Growth/No Growth Interface of Brochothrix Thermosphacta As a Function of pH and Water Activity” en *Food Microbiology*, Volume 17, Issue 5, p. 485-493.
- Marcelo Signorini. (2007). “Microbiología de carnes envasadas al vacío y la biopreservación como medio para prolongar la vida de anaquel” en *Nacameh*, vol. 1, p. 26-40.
- Minetti, A.C. (2002). *Marketing de alimentos ecológicos*. Madrid: Pirámide/ESIC.
- Mossel, D. A., Moreno García, B. y Struijk, C.B. (2003). *Microbiología de los alimentos: fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la integridad (inocuidad y calidad) microbiológica de los alimentos*. Zaragoza: Acribia. p. 493, 510, 636.
- Norma Heredia et al., (2014). “Productos cárnicos: principales patógenos y estrategias no térmicas de control” en *Nacameh*, p. 12-14.
- Stiles ME (1996). “Biopreservation by lactic acid bacteria” en *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 70, p. 331-345.
- Trinderup, C.H. et al. (2013). “A Comparison of Meat Colour Measurements From a Colorimeter and Multispectral Images” en *Proceedings of International Conference on Near Infrared Spectroscopy 2013*, p. 741-749.
- Víctor Leonardo. (2013). *Evaluación de La Calidad Microbiológica de Cortes Bovinos Envasados al Vacío y Mantenidos a Temperatura de Refrigeración*. Jorge Fernández, Cristina López, Pablo Formento. Trabajo fin de grado. Uruguay: Universidad de la República-Facultad de Veterinaria.