



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

**PRODUCCIÓN Y RECUPERACIÓN DE SUSTANCIAS
BIOCONSERVANTES A PARTIR DE CULTIVOS
INICIADORES DE PRODUCTOS CÁRNICOS CURADOS**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Carlos Alberto De Jesus De Barros

Dirigida por:

María Jesús Pagán Moreno

Purificación García Segovia

Valencia, Octubre 2016



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Departamento de Tecnología de Alimentos

D^A. MARÍA JESÚS PAGAN MORENO, PROFESORA TITULAR DE LA UNIVERSIDAD Y D^A. PURIFICACIÓN GARCÍA SEGOVIA, PROFESORA TITULAR DE LA UNIVERSIDAD, AMBAS DEL DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE LA UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

CONSIDERAN: Que la memoria titulada PRODUCCIÓN Y RECUPERACIÓN DE SUSTANCIAS BIOCONSERVANTES A PARTIR DE CULTIVOS INICIADORES DE PRODUCTOS CÁRNICOS CURADOS que presenta D. CARLOS ALBERTO DE JESUS DE BARROS para aspirar al grado de Doctor por la Universitat Politècnica de València, y que ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universitat Politècnica de València, reúne las condiciones adecuadas para constituir su tesis doctoral, por lo que AUTORIZAN al interesado para su presentación.

Valencia, Octubre 2016

Fdo.: María Jesús Pagán Moreno
Directora de Tesis

Fdo.: Purificación García Segovia
Directora de Tesis

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido a la realización de este proyecto de tesis:

A mis tutoras: María Jesús Pagán, por permitirme trabajar en este proyecto, por la confianza, por enseñarme tantas cosas estos años y por apoyarme siempre. A Purificación García, por su valiosa contribución en este trabajo y por enseñarme también otras tantas cosas.

A Javier Martínez, por guiarme también en este proyecto y en tantos otros, por su apoyo, y por todo lo que me ha enseñado.

A Amparo Andrés, por sus valiosos consejos durante el desarrollo de esta tesis, por tenderme su mano en todo momento, y por lo que he aprendido de ella y lo que hemos aprendido juntos.

A Zaida, Elena y Aida, por su gran ayuda y contribución en el desarrollo experimental de este trabajo.

A Milagro Reig, por su valiosa colaboración en toda la parte de análisis cromatográfico de este proyecto, por su interés y por compartir conmigo sus conocimientos.

A Arantxa Rizo, por el intercambio de experiencias y conocimientos que hemos tenido durante estos años, por enseñarme muchas cosas y por ayudarme siempre.

A María Guadalupe Hernández, por su colaboración y por compartir sus conocimientos y puntos de vista.

A Édgar Pérez, por brindarme consejos muy útiles en la fase final de la tesis.

Por último, un agradecimiento especial a la empresa colaboradora, por la iniciativa de este proyecto, que aún continúa. A Alicia, Mónica y Daniele, por su interés y valiosa contribución.

RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue estudiar las posibilidades tecnológicas de producir bioconservantes para productos cárnicos a partir de los subproductos del proceso de fermentación de dos cepas de bacterias ácido-lácticas, *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus pentosaceus*. Ambas son parte de la colección de cultivos starter de la empresa colaboradora del proyecto, y son comercializadas con este fin.

En una primera parte, se estudiaron las condiciones de producción industrial de los cultivos iniciadores para determinar las curvas de crecimiento de los mismos en un medio de cultivo de referencia (MRS) y en medios experimentales. Considerando que los recuentos más altos y la mayor producción de ácidos (mayor descenso de pH) se obtuvieron con MRS, se seleccionó este medio para desarrollar las siguientes fases del proyecto.

A continuación, se estudiaron técnicas para la estabilización microbiológica de los caldos de fermentación de manera que el efecto antimicrobiano dependiese únicamente de los metabolitos producidos al inactivarse los microorganismos vivos. Dichas técnicas fueron la pasteurización, la purificación parcial y la filtración. Para determinar el efecto del proceso de estabilización sobre las propiedades antimicrobianas de los caldos estabilizados, se realizaron pruebas in vitro con *Listeria innocua* como microorganismo diana. Así, se observó que la pasteurización (P) y la filtración mantenían las propiedades antimicrobianas del caldo, a diferencia de la purificación parcial (PP), a través de la cual se perdía completamente el poder antimicrobiano. Finalmente se seleccionó la técnica de Filtración (F) dado que es un procedimiento que permitiría recuperar los microorganismos viables (para la producción de cultivos starter) mientras se obtiene un caldo estabilizado con los metabolitos antimicrobianos, a diferencia de la pasteurización, que al tratarse de un tratamiento térmico impide la recuperación de microorganismos vivos.

Considerando el efecto antimicrobiano observado, se caracterizó la producción de ácidos orgánicos y la presencia de otras sustancias antimicrobianas, como el peróxido de hidrógeno o las bacteriocinas. Ambas no pudieron ser detectadas en los caldos de fermentación, de modo que en las condiciones estudiadas, el efecto antimicrobiano se atribuye exclusivamente a la presencia de ácidos orgánicos. Para caracterizar la capacidad antimicrobiana se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima letal (CML). Comparando el efecto antimicrobiano de los caldos de fermentación de 24 horas de ambos microorganismos sobre *L. innocua*, se observó que la CMI y la CML fueron inferiores para el caldo de *L. plantarum* (L-24F) en comparación con los de *P. pentosaceus* (P-24F), lo cual se relaciona a una mayor producción de ácidos del primero.

Como se ha comentado anteriormente, este proyecto tiene como finalidad elaborar un producto bioconservante que pudiera ser incorporado de forma conveniente en un producto cárnico. Para ello, se obtuvieron productos en polvo a partir del extracto libre de células empleando las técnicas de secado por atomización y liofilización. Se testaron como soportes dextrina o maltodextrina. Los bioconservantes en polvo mostraron un efecto antimicrobiano *in vitro* (sobre *L. innocua*) inferior al de los caldos, lo cual se atribuyó a la presencia del soporte. Por otra parte, se ensayó además el efecto antimicrobiano sobre *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7, dos microorganismos patógenos de interés en el sector cárnico. En ambos casos se obtuvo un efecto antimicrobiano similar al observado para el caso de *L. innocua*. El producto obtenido a partir de *L. plantarum* fue el que mostró un poder antimicrobiano mayor en base a la CMI y CML, en concordancia con la mayor producción de ácidos, observada en los caldos de fermentación antes del proceso de secado.

Por último, una vez caracterizada la actividad antimicrobiana de los productos en polvo, se estudió el efecto antimicrobiano de los mismos sobre la flora autóctona de productos cárnicos. En el caso de L-24F los ensayos se realizaron en carne picada de cerdo, observándose un efecto inhibitorio importante especialmente sobre las enterobacterias. En el caso de P-24F se realizó un estudio similar pero en carne picada de pollo,

analizándose además la aplicación del bioconservante en conjunto con el envasado en atmósfera modificada (MAP) (22% O₂, 30% CO₂, y 48% N₂). Se observó un efecto sinérgico del bioconservante y MAP, con una reducción importante del crecimiento de *Pseudomonas* y *Brochothrix thermosphacta*. Tanto con L-24F, como con P-24F se obtuvo un efecto desfavorable en el producto cárnico al aumentar la concentración de los mimos, debido a una disminución de su capacidad de retención de agua y a cambios en el color.

Los resultados de esta tesis demuestran la posibilidad de producir bioconservantes a partir de los cultivos starter *L. plantarum* y *P. pentosaceus* de la empresa colaboradora, aunque debe considerarse las características del producto cárnico y las dosis requeridas para lograr la extensión deseada de la vida útil del producto sin alterar sus propiedades fisicoquímicas y sensoriales.

RESUM

L'objectiu d'esta tesi va ser estudiar les possibilitats tecnològiques de produir bioconservants per a productes càrnics a partir dels subproductes del procés de fermentació de dos ceps de bacteris àcid-làctiques, *Lactobacillus plantarum* i *Pediococcus pentosaceus*. Ambdós són part de la col·lecció de cultius estàrter de l'empresa col·laboradora del projecte i són comercialitzades amb este fi. En una primera part, es van estudiar les condicions de producció industrial dels cultius iniciadors per a determinar les corbes de creixement dels mateixos en un mitjà de cultiu de referència (MRS) i en mitjans experimentals. Considerant que els recomptes més alts i la major producció d'àcids (major descens de pH) es van obtenir amb MRS, es va seleccionar este mig per a desenrotllar les següents fases del projecte.

A continuació, es van estudiar tècniques per a l'estabilització microbiològica dels caldos de manera que l'efecte antimicrobià depenguera únicament dels metabòlits produïts a l'inactivar-se els microorganismes vius. Dites tècniques van ser la pasteurització, la purificació parcial i la filtració. Per a determinar l'efecte del procés d'estabilització sobre les propietats antimicrobianes dels caldos estabilitzats, es van realitzar proves *in vitro* amb *Listeria innocua* com a microorganisme diana. Així, es va observar que la Pasteurització (P) i la Filtració (F) mantenien les propietats antimicrobianes del caldo, a diferència de la purificació parcial (PP), a través de la qual es perdia completament el poder antimicrobià. Finalment es va seleccionar la tècnica de Filtració atès que és un procediment que permetria recuperar els microorganismes viables (per a la producció de cultius estàrter) mentre s'obté un caldo estabilitzat amb els metabòlits antimicrobians, a diferència de la pasteurització, que al tractar-se d'un tractament tèrmic impedia la recuperació de microorganismes vius.

Considerant l'efecte antimicrobià observat, es va caracteritzar la producció d'àcids orgànics i la presència d'altres substàncies antimicrobianes, com el peròxid d'hidrogen o les bacteriocines. Ambdós no van poder ser detectades en els caldos de fermentació, de

manera que en les condicions estudiades, l'efecte antimicrobià s'atribuïx exclusivament a la presència d'àcids orgànics. Per a caracteritzar la capacitat antimicrobiana es va determinar la concentració mínima inhibidora (CMI) i la concentració mínima letal (CML). Comparant l'efecte antimicrobià dels caldos de fermentació de 24 hores dels dos microorganismes sobre *L. innocua*, es va observar que la CMI i la CML van ser inferiors per al caldo de *L. plantarum* (L-24F) en comparació amb els de *P. pentosaceus* (P-24F), la qual cosa es relaciona a una major producció d'àcids del primer.

Com s'ha comentat anteriorment, este projecte té com a finalitat elaborar un producte bioconservant que poguera ser incorporat de forma convenient en un producte càrnic. Per a això, es van obtenir productes en pols a partir de l'extracte lliure de cèl·lules emprant les tècniques d'assecat per atomització i liofilització. Es van testar com a suports dextrina o maltodextrina. Els bioconservants en pols van mostrar un efecte antimicrobià in vitro (sobre *L. innocua*) inferior al dels caldos, la qual cosa es va atribuir a la presència del suport. D'altra banda, es va assajar a més l'efecte antimicrobià sobre *L. monocytogenes* i *E. coli* O157:H7, dos microorganismes patògens d'interès en el sector càrnic. En ambdós casos es va obtenir un efecte antimicrobià semblant a l'observat per al cas de *L. innocua*. El producte obtingut a partir de *L. plantarum* va ser el que va mostrar un poder antimicrobià major basant-se en la CMI i CML, en concordança amb una major producció d'àcids, observada en les caldos de fermentació abans del procés d'assecat.

Finalment, una vegada caracteritzada l'activitat antimicrobiana dels productes en pols, es va estudiar l'efecte antimicrobià dels mateixos sobre la flora autòctona de productes càrnics. En el cas de L-24F els assajos es van realitzar en carn picada de porc, observant-se un efecte inhibitori important especialment sobre les enterobacteries. En el cas de P-24F es va realitzar un estudi semblant però en carn picada de pollastre, analitzant-se a més l'aplicació amb del bioconservant en conjunt amb l'envasament en atmosfera modificada (MAP) (22% O₂, 30% CO₂, i 48% N₂). Es va observar un efecte sinèrgic del bioconservant i MAP, amb una reducció important del creixement de pseudomonas i *Brochothrix thermosphacta*. Tant amb L-24F, com amb P-24F es va obtenir un efecte desfavorable en

el producte càrnic a l'augmentar la concentració dels mateixos, a causa d'una disminució de la seua capacitat de retenció d'aigua i a canvis en el color.

Els resultats d'esta tesi demostren la possibilitat de produir bioconservants a partir dels cultius estàter *L. plantarum* i *P. pentosaceus* de l'empresa col·laboradora, encara que han de considerar-se les característiques del producte càrnic i les dosis requerides per a aconseguir l'extensió desitjada de la vida útil del producte sense alterar les seues propietats fisicoquímiques i sensorials.

SUMMARY

The aim of this thesis was to study the technological possibilities of producing biopreservatives for meat products using the by-products obtained from the fermentation process of two strains of lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus*. Both are part of the collection of starter cultures of the collaborating company of this project, and are marketed for this purpose.

In the first part of this project, the conditions of industrial production of starter cultures were studied to determine the growth curves in a reference culture medium (MRS) and in experimental media. Whereas the highest counts and increased production of acids (greater decrease in pH) were obtained in MRS, this medium was selected to be used in the next phases of the project.

Next, different techniques for microbiological stabilization of the exhausted culture broths were tested, so that the antimicrobial effect would depend only on the metabolites produced by the microorganisms studied. Such techniques were pasteurization, partial purification and filtration. To determine the effect of the stabilization process on the antimicrobial properties of the stabilized broths, *in vitro* tests were performed against *Listeria innocua* as target microorganism. Thus, it was observed that pasteurization (P) and filtration (F) kept the antimicrobial properties of broths, unlike partial purification (PP), through which the antimicrobial activity was completely lost. Finally the filtration technique (F) was selected since this procedure would recover viable microorganisms (for producing starter cultures) while it is obtained an stabilized broth with its antimicrobial metabolites, unlike pasteurization because in this case the heat treatment kills the living microorganisms.

Considering the antimicrobial effect observed, it was studied the production of organic acids and the presence of other antimicrobial substances, such as hydrogen peroxide or bacteriocins. Both could not be detected in the fermentation broths, so that in the

conditions studied, the antimicrobial effect is attributed only to the presence of organic acids. To characterize the antimicrobial capacity it was determined the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum lethal concentration (CML). Comparing the antimicrobial effect of fermentation broths of 24 hours of both microorganisms on *L. innocua*, it was observed that the MIC and CML were lower for *L. plantarum* broth (L-24F) compared with *P. pentosaceus* broth (P-24F), which is related to the yield of acid.

As stated above, this project aims to develop a biopreservative that could be conveniently incorporated in a meat product. For this purpose, two drying techniques of the cell-free broths were compared: spray drying and lyophilization. Both allow obtaining a powdered product. Two support substances were tested, dextrin or maltodextrin. The powdered biopreservatives showed lower antimicrobial effect *in vitro* (on *L. innocua*) than broths, which was attributed to the presence of the support. Moreover, it was tested the antimicrobial effect on *L. monocytogenes* and *E. coli O157:H7*, two pathogens of interest in the meat sector. In both cases, it was observed an antimicrobial effect similar to that obtained over *L. innocua*. The product obtained from *L. plantarum* showed the greatest antimicrobial capacity based on MIC and CML, in accordance to the increased acid production observed in fermentation broths before the drying process.

Finally, after characterizing the antimicrobial activity of powdered products, the antimicrobial effect on the native flora of meat products was studied. In the case of the powdered product obtained for *L. plantarum* (L-24FR) this study was performed in raw minced pork, showing a significant inhibitory effect especially over enterobacteria. In the case of the product obtained from *P. pentosaceus* (P-24FR,) a similar study was conducted but utilizing raw minced chicken. In this case it was also analyzed the use of the biopreservative along with modified atmosphere packaging (MAP) (22% O₂, 30% CO₂ and 48% N₂). It was observed a synergistic effect of the biopreservative and MAP, with a significant reduction of *Brochothrix thermosphacta* and pseudomonas counts. Both L-24FR and P-24FR exerted a negative effect on the meat product as their concentration augmented, due to a decrease in water holding capacity and changes in color.

The results of this thesis show the possibility of producing biopreservatives from *L. plantarum* and *P. pentosaceus* starter cultures from the collaborating company, although it should be considered the specific characteristics of the meat product and the doses required to achieve the desired extension of shelf life without altering its physicochemical and sensory properties.

ÍNDICE GENERAL

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	7
I.1 ALTERACIÓN DE LA CARNE Y DE LOS PRODUCTOS CÁRNICOS	9
I.1.1 Aspectos que condicionan el crecimiento microbiano	9
I.1.2 La “tecnología de los obstáculos” como estrategia para la conservación de productos cárnicos	15
I.1.3 Microorganismos alterantes de la carne	15
I.1.4 Microorganismos patógenos en la carne	21
I.2 LA BIOCONSERVACIÓN Y LAS BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS	24
I.2.1 Cultivos protectores	27
I.2.2 Ácidos orgánicos	28
I.2.3 Bacteriocinas.....	31
I.2.4 Péptidos antimicrobianos.....	38
I.2.5 Bacteriófagos	38
I.2.6 Peróxido de hidrógeno	39
I.2.7 Reuterina	39
I.2.8 Dia cetilo.....	40
I.2.9 CO ₂	40
I.2.10Otros compuestos.....	40
I.3 BIOCONSERVANTES COMERCIALES	41
I.4 LOS CULTIVOS STARTER	42
I.4.1 Proceso de producción de cultivos starter.....	44
I.5 REFERENCIAS.....	47
II. CARACTERIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE LOS CULTIVOS STARTER DE <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> Y <i>PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS</i>.....	59
II.1 INTRODUCCIÓN.....	61
II.2 OBJETIVOS.....	63
II.3 MATERIALES Y MÉTODOS	64
II.3.1 Plan de trabajo.....	64
II.3.2 Metodología.....	66
II.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	73
II.4.1 Caracterización del proceso de producción de los cultivos iniciadores	73
II.4.2 Estudio de la fermentación en medios de cultivo alternativos.....	77
II.4.3 Actividad antimicrobiana de los CFE obtenidos durante el crecimiento de <i>L. plantarum</i> o <i>P. pentosaceus</i> en MRS.....	85
II.5 CONCLUSIONES.....	87
II.6 REFERENCIAS.....	89

III. DETERMINACIÓN DE LOS PRINCIPALES COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS PRODUCIDOS POR *L. PLANTARUM* Y *P. PENTOSACEUS* Y CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA..... 95

III.1	INTRODUCCIÓN	97
III.2	OBJETIVOS.....	99
III.3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	100
III.3.1	Recuperación y estabilización de los compuestos antimicrobianos y evaluación de su eficacia	102
III.3.2	Identificación y cuantificación de compuestos con actividad antimicrobiana	106
III.3.3	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Letal (CML) de los extractos libres de células (CFEs).....	110
III.3.4	Obtención de un producto deshidratado a partir de los extractos libres de células (CFE) y determinación de su actividad antimicrobiana	112
III.3.5	Análisis estadístico	115
III.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	115
III.4.1	Recuperación y estabilización de los compuestos antimicrobianos y evaluación de su eficacia	115
III.4.2	Identificación y cuantificación de compuestos con actividad antimicrobiana	121
III.4.3	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Letal (CML) de los extractos libres de células (CFE)	133
III.4.4	Determinación de la actividad antimicrobiana de los productos deshidratados elaborados a partir de los extractos libres de células (CFEs)	135
III.5	CONCLUSIONES.....	142
III.6	REFERENCIAS	144

IV. APLICACIÓN EN CARNE DE CERDO DE UN BIOCONSERVANTE OBTENIDO A PARTIR DE UN CULTIVO STARTER DE *L. PLANTARUM* 151

IV.1	INTRODUCCIÓN	153
IV.2	OBJETIVOS.....	156
IV.3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	156
IV.3.1	Plan de trabajo	156
IV.3.2	Elaboración del bioconservante L-24FR.....	157
IV.3.3	Preparación de las muestras	158
IV.3.4	Análisis microbiológico.....	158
IV.3.5	Análisis fisicoquímico	161
IV.3.6	Análisis estadístico	162
IV.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	162
IV.4.1	Efecto de L-24FR sobre la microbiota de la carne picada de cerdo	162
IV.4.2	Efecto de L-24FR sobre las propiedades fisicoquímicas de carne picada de cerdo... ..	171
IV.5	CONCLUSIONES.....	178
IV.6	REFERENCIAS	180

V. APLICACIÓN DE UN BIOCONSERVANTE OBTENIDO A PARTIR DE UN CULTIVO STARTER DE <i>P. PENTOSACEUS</i> EN CARNE DE POLLO	185
V.1 INTRODUCCIÓN.....	187
V.2 OBJETIVOS.....	190
V.3 MATERIALES Y MÉTODOS	190
V.3.1 Plan de trabajo.....	190
V.3.2 Elaboración del bioconservante P-24FR.....	192
V.3.3 Efecto de P-24FR sobre carne picada de pollo	193
V.3.4 Determinaciones fisicoquímicas.....	195
V.3.5 Efecto de P-24FR en la carne picada de pollo en MAP.....	195
V.3.6 Análisis estadístico.....	197
V.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	197
V.4.1 Efecto de P-24FR sobre la carne picada de pollo	197
V.4.2 Efecto del bioconservante P-24FR en la carne de pollo envasada en atmósfera modificada (MAP)	210
V.5 CONCLUSIONES.....	220
V.6 REFERENCIAS.....	222
VI. CONSIDERACIONES FINALES Y RECOMENDACIONES	227

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I-1. Factores que afectan el crecimiento microbiano y cambios que se producen en la carne debidos a la alteración	9
Figura I-2. Proceso discontinuo de producción de cultivos starter	45
Figura II-1. Plan de trabajo del Capítulo I	65
Figura II-2. Obtención de las curvas de crecimiento a 30 y 37°C	67
Figura II-3. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos libres de células (CFE)	72
Figura II-4. Curvas de crecimiento de <i>L. plantarum</i> a 30 y 37°C	73
Figura II-5. Variaciones producidas por <i>L. plantarum</i> en la densidad óptica (OD, 600 nm) (a) y el pH (b) durante la fermentación en MRS a 30 y 37°C	75
Figura II-6. Curvas de crecimiento de <i>P. pentosaceus</i> a 30 y 37°C	76
Figura II-7. Variaciones producidas por <i>P. pentosaceus</i> en la densidad óptica (OD, 600 nm) (a) y el pH (b) durante la fermentación en MRS a 30 y 37°C	77
Figura II-8. Curva de crecimiento de <i>L. plantarum</i> (a) y <i>P. pentosaceus</i> (b) obtenidas a 37°C en MRS, C1 y C2	78
Figura II-9. Variación del pH para <i>L. plantarum</i> (a) y <i>P. pentosaceus</i> (b) en los tres medios de cultivo utilizados	84
Figura II-10. Variación de la densidad óptica (OD, 600 nm) para <i>L. plantarum</i> (a) <i>P. pentosaceus</i> (b) en los tres medios de cultivo utilizados	85
Figura II-11. Factor de Inhibición (FI) sobre <i>L. innocua</i> de los extractos libres de células (al 50%) de <i>L. plantarum</i> (a) y <i>P. pentosaceus</i> (b) obtenidos a diferentes tiempos durante la fermentación en MRS	87
Figura III-1. Plan de trabajo del Capítulo III.....	101
Figura III-2. Curvas de crecimiento en MRS (Capítulo II) y tiempos de extracción de muestra de <i>L. plantarum</i> y <i>P. pentosaceus</i>	102
Figura III-3. Determinación de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar	105
Figura III-4. Determinación preliminar de la actividad antimicrobiana de los caldos de fermentación por el método de dilución en caldo.....	106
Figura III-5. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima letal (CML) de los caldos de fermentación.....	111
Figura III-6. Cromatogramas de ácidos orgánicos obtenidos por HPAEC: concentraciones de los ácidos láctico y acético en los caldos de fermentación de <i>L. plantarum</i> (a) y de <i>P. pentosaceus</i> (b) para t = 0 h y t = 48 h	122

Figura III-7. Cromatogramas de ácidos orgánicos obtenidos por RP-HPLC-DAD: patrón de ácido láctico (a), producción de ácido láctico por <i>L. plantarum</i> (b) y <i>P. pentosaceus</i> (c) durante el proceso fermentativo	124
Figura III-8. Parámetros del metabolismo <i>L. plantarum</i> (a) y <i>P. pentosaceus</i> (b): consumo de glucosa, producción de ácido y cambio de pH	125
Figura III-9. Curvas de crecimiento de <i>L. plantarum</i> y <i>P. pentosaceus</i> con tiempos de fermentación seleccionados	125
Figura III-10. Efecto antimicrobiano de los CFE liofilizados L-24FR (a) y P-24FR (b) sobre <i>Listeria innocua</i> en carne picada de cerdo	139
Figura III-11. Cambios en el pH según la concentración de los CFE liofilizados L-24FR (a) o P-24FR (b) en carne picada de cerdo inoculada con <i>L. innocua</i>	142
Figura IV-1. Plan de trabajo del Capítulo IV.....	157
Figura IV-2. Efecto de diferentes concentraciones (g/kg) de L-24FR sobre aerobios mesófilos en carne picada de cerdo	163
Figura IV-3. Crecimiento de enterobacterias en carne picada de cerdo tratada con diferentes concentraciones de L-24FR.....	166
Figura IV-4. Crecimiento de bacterias ácido-lácticas en carne picada de cerdo tratada con diferentes concentraciones de L-24FR.....	169
Figura IV-5. Cambios en el pH durante el almacenamiento de carne picada de cerdo tratada con L-24FR	171
Figura IV-6. Pérdida de agua por goteo (%) de la carne picada de cerdo con diferentes concentraciones de L-24FR.....	173
Figura IV-7. Diferencias de color ($\Delta E \pm SE$) con respecto a la muestra control (0g/kg) de carne picada de cerdo tratada con L-24FR durante el almacenamiento	174
Figura IV-8. Cambios en los espectros de reflectancia en la región del visible en la carne de cerdo: (a) sin L-24FR (0 g) durante el almacenamiento, y (b) para diferentes concentraciones de L-24FR a los 8 días de almacenamiento	176
Figura IV-9. Cociente de las reflectancias a 630 y 580 nm ($R_{630/580}$) durante el almacenamiento de la carne de cerdo tratada con L-24FR a diferentes concentraciones	177
Figura IV-10. Cambios en la luminosidad (L^*) durante el almacenamiento de la carne de cerdo tratada con diferentes dosis de L-24FR	178
Figura V-1. Plan de trabajo del Capítulo V	192
Figura V-2. Curvas de crecimiento de aerobios mesófilos en carne de pollo tratada con P-24FR a concentraciones de 0, 10, 20 y 30 g/kg (a) y 0, 40, 50 y 60 g/kg (b)	197
Figura V-3. Curvas de crecimiento de bacterias ácido-lácticas (BAL) en carne de pollo tratada con P-24FR a concentraciones de 0, 10, 20 y 30 g/kg (a) y 0, 40, 50 y 60 g/kg (b)	200

Figura V-4. Crecimiento de <i>Pseudomonas spp.</i> en carne de pollo tratada con P-24FR a concentraciones de 0, 10, 20 y 30 g/kg (a) y 0, 40, 50 y 60 g/kg (b)	202
Figura V-5. Crecimiento de <i>Brochothrix thermosphacta</i> en carne de pollo tratada con P-24FR a concentraciones de 0, 10, 20 y 30 g/kg (a) y 0, 40, 50 y 60 g/kg (b)	203
Figura V-6. Cambios en el pH de la carne picada de pollo con diferentes concentraciones de P-24FR	205
Figura V-7. Pérdida de agua por goteo (DL) en carne picada de pollo con diferentes concentraciones de P-24FR	207
Figura V-8. Cromo (C_{ab}^*) durante el almacenamiento de la carne de pollo tratada con diferentes concentraciones de P-24FR.....	208
Figura V-9. Espectros de reflectancia de la carne de pollo con diferentes concentraciones de P-24FR, (a) a los 0 días y (b) a los 9 días de almacenamiento.....	209
Figura V-10. Diferencias de color (ΔE) calculadas con respecto a la muestra control (0 g/Kg) durante el almacenamiento de la carne picada de pollo tratada con P-24FR a diferentes concentraciones (g/kg)	210
Figura V-11. Curvas de crecimiento de aerobios mesófilos en carne de pollo en MAP con diferentes concentraciones de P-24FR.....	211
Figura V-12. Curvas de crecimiento de BAL en pollo envasado en MAP y con diferentes concentraciones de P-24FR	212
Figura V-13. Curvas de crecimiento de <i>Pseudomonas spp.</i> en carne de pollo envasada en MAP y con diferentes concentraciones de P-24FR.....	214
Figura V-14. Curvas de crecimiento de <i>B. thermosphacta</i> en carne de pollo envasada en MAP y con diferentes concentraciones de P-24FR.....	215
Figura V-15. Variación del pH de la carne de pollo en MAP tratada con diferentes concentraciones de P-24FR	217
Figura V-16. Cromo (C_{ab}^*) y luminosidad (L^*) y durante el almacenamiento de la carne de pollo tratada con diferentes concentraciones de P-24FR.....	218
Figura V-17. Espectros de reflectancia (%) de la carne de pollo en MAP con diferentes concentraciones de P-24FR para t = 0 d (a) y t = 9 d (b).....	219
Figura V-18. Diferencias en Color (ΔE) de la carne de pollo en MAP tratada con bioconservante (20 y 30 g/kg) y comparadas con la muestra control (0 g/kg)	220

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I-1. Compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular producidos por bacterias ácido lácticas	26
Tabla II-1. Composición de los medios de cultivo (%m/v) MRS, C1 y C2	69
Tabla II-2. Parámetros de crecimiento de <i>L. plantarum</i> (\pm error estándar) (modelo de Baranyi & Roberts, 1994) obtenidos a partir de los recuentos a 30 y 37°C.....	74
Tabla II-3. Parámetros de crecimiento de <i>P. pentosaceus</i> (\pm error estándar) (modelo de Baranyi & Roberts, 1994) obtenidos a partir de los recuentos a 30 y 37°C.....	76
Tabla II-4. Valores de los parámetros de crecimiento (\pm error estándar) de <i>L. plantarum</i> (modelo de Baranyi & Roberts, 1994) obtenidos a partir de los recuentos a 37°C en los medios de cultivo MRS, C1 y C2.....	79
Tabla III-1. Condiciones de atomización de los extractos libres de células (CFEs) de <i>L. plantarum</i> y <i>P. pentosaceus</i>	112
Tabla III-2. Actividad antimicrobiana de los extractos a diferentes tiempos de fermentación (h) de <i>L. plantarum</i> (L) y <i>P. pentosaceus</i> (P) en MRS	116
Tabla III-3. Actividad antimicrobiana sobre <i>L. innocua</i> de los caldos de fermentación de <i>L. plantarum</i> (L) obtenidos a diferentes tiempos 3, 14 y 24 h) en función de la concentración (90, 70 y 50%) y el tratamiento de estabilización.....	118
Tabla III-4. Actividad antimicrobiana sobre <i>L. innocua</i> de los caldos de fermentación <i>P. pentosaceus</i> (P) obtenidos a diferentes tiempos (4, 14 y 24 h) en función de la concentración (90, 70 y 50%) y el tratamiento de estabilización.....	120
Tabla III-5. Actividad antimicrobiana sobre <i>L. innocua</i> medida a través de los cambios de densidad óptica (OD) de los CFEs	129
Tabla III-6. Actividad antimicrobiana de los caldos de <i>L. plantarum</i> (L) y <i>P. pentosaceus</i> (P) sobre <i>L. innocua</i> , <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>L. monocytogenes</i> , en base a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Letal (CML).	133
Tabla III-7. Contenido de sólidos totales (%p/v) de los extractos libres de células (CFE) de 24 horas de fermentación de <i>L. plantarum</i> (L-24F) y <i>P. pentosaceus</i> (P-24F) con 10%p/v de dextrina (D) o maltodextrina (M)	135
Tabla III-8. Actividad antimicrobiana (CMI y CML) sobre <i>L. innocua</i> de los CFE de <i>L. plantarum</i> y <i>P. pentosaceus</i> deshidratados por atomización, empleando dextrina (D) o maltodextrina (M) como soportes	136
Tabla III-9. Actividad antimicrobiana (CMI y CML) sobre <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>L. monocytogenes</i> de los CFE deshidratados por atomización (dextrina como soporte) provenientes de los caldos de fermentación de <i>L. plantarum</i> y <i>P. pentosaceus</i>	137

Tabla III-10. Actividad antimicrobiana (CMI y CML) sobre <i>L. innocua</i> de los productos obtenidos a partir de los CFE de <i>L. plantarum</i> y <i>P. pentosaceus</i> , liofilizados utilizando dextrina (D) o maltodextrina (M) como soporte	138
Tabla III-11. Actividad antimicrobiana (CMI y CML) sobre <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>L. monocytogenes</i> de los caldos de <i>L. plantarum</i> y <i>P. pentosaceus</i> deshidratados por liofilización (dextrina como soporte)	138
Tabla III-12. Parámetros de crecimiento de <i>L. innocua</i> en función de la concentración de los extractos libres de células (CFE) liofilizados de <i>L. plantarum</i> o <i>P. pentosaceus</i> (L-24FR o P-24FR) en carne picada de cerdo	140
Tabla IV-1. Parámetros del modelo de crecimiento (Baranyi & Roberts, 1994) de aerobios mesófilos en carne picada de cerdo con diferentes concentraciones de L-24FR	164
Tabla IV-2. Parámetros de los modelos de crecimiento e inactivación de enterobacterias en carne picada de cerdo con diferentes concentraciones de L-24FR	167
Tabla IV-3. Parámetros del modelo de crecimiento de Baranyi & Roberts (1994) bacterias ácido-lácticas (BAL) en carne picada de cerdo con diferentes concentraciones de L-24FR	170
Tabla V-1. Parámetros obtenidos de los modelos de crecimiento de aerobios mesófilos en carne de pollo con diferentes concentraciones de P-24FR	198
Tabla V-2. Parámetros de crecimiento del modelo de Baranyi & Roberts (1994) de bacterias ácido-lácticas en carne de pollo con diferentes concentraciones de P-24FR	200
Tabla V-3. Parámetros del modelo de crecimiento de Baranyi & Roberts (1994) de <i>Pseudomonas spp.</i> en carne de pollo con diferentes concentraciones de P-24FR	202
Tabla V-4. Parámetros de los modelos de crecimiento e inactivación de <i>B. thermosphacta</i> en carne de pollo con diferentes concentraciones de P-24FR	204
Tabla V-5. Parámetros de los modelos de crecimiento de aerobios mesófilos en carne de pollo envasada en MAP con diferentes concentraciones de P-24FR	211
Tabla V-6. Parámetros de crecimiento de las bacterias ácido-lácticas según el modelo de Baranyi & Roberts (1994) en carne de pollo envasada en MAP, con diferentes concentraciones de P-24FR	213
Tabla V-7. Parámetros de los modelos de crecimiento e inactivación de <i>Pseudomonas spp.</i> en carne de pollo en MAP, con diferentes concentraciones de P-24FR	215
Tabla V-8. Parámetros de los modelos crecimiento de <i>Brochothrix thermosphacta</i> en carne de pollo en MAP, con diferentes concentraciones de P-24FR	216

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

|

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

La industria cárnica en España ocupa el primer lugar en importancia comercial en el sector alimentario, con una cifra de negocio de 22.000 millones de euros, representando así el 21% del sector y el 13,1% del PIB de las industrias del país (Aral, 2016). Para mantener su impulso económico, el sector debe mantenerse vigilante a los cambios en los hábitos del consumidor y su apreciación de los alimentos, siendo evidente por ejemplo, la preocupación creciente sobre los efectos de la alimentación sobre la salud (Federación Española de Industrias de la Alimentación y Bebidas (FIAB), s. f.). En este sentido, el consumidor se inclina por la adquisición de alimentos mínimamente procesados, sin aditivos o conservantes químicos, lo cual, sin embargo, entra en contradicción con el interés de consumir alimentos de mayor calidad sensorial y a la vez seguros (Castellano, Belfiore, Fadda, & Vignolo, 2008).

Por otra parte, el consumidor actual demanda alimentos procesados, cuya preparación involucre un ahorro de tiempo (Riesco, Picaza, & Barañano, 2016). La industria cárnica responde a esta tendencia con productos envasados listos para cocinar, como cortes de carne fresca o carne picada (siendo frecuente encontrarlos ya adobados con sal y especias). La elaboración de estos productos requiere procesos de despiece, cortado o picado, que conllevan un mayor nivel de manipulación e incrementan el contacto con el oxígeno atmosférico, lo cual puede comprometer su estabilidad microbiana y fisicoquímica. Por ello, además de mantener buenas prácticas higiénicas, se deben aplicar estrategias de conservación que permitan mantener la calidad y seguridad del producto, utilizando diferentes métodos de conservación, como las atmósferas modificadas (MAP) y/o la refrigeración. Adicionalmente, la industria cárnica recurre en muchos casos a la incorporación de los conservantes químicos autorizados (Reglamento (UE) N° 1129/2011), como el dióxido de azufre, sulfitos, nitratos, nitritos y acetato potásico. Sin embargo, como se comentó anteriormente, hoy en día los consumidores demandan alimentos “libres de”, una tendencia ya establecida en el mercado alimentario y que continuará en los próximos años (Riesco et al., 2016). Así, la presencia de conservantes químicos suele percibirse de

forma negativa, por lo cual, la industria cárnica (y la industria alimentaria, en general) debe plantearse la aplicación de conservantes naturales que permitan la sustitución parcial o completa de los conservantes químicos. En este sentido, las técnicas de bioconservación constituyen una alternativa. Consisten en la adición en el alimento de microorganismos vivos (productores de sustancias antimicrobianas) o sus metabolitos, de manera que se pueda producir un efecto inhibitorio o letal sobre bacterias alterantes o patógenas, manteniéndose así su seguridad y vida útil. Los microorganismos generalmente utilizados son bacterias ácido-lácticas, que se caracterizan por producir compuestos antimicrobianos como ácidos orgánicos, bacteriocinas y peróxido de hidrógeno, entre otros. Estos microorganismos, usualmente utilizados en la elaboración de alimentos fermentados, son considerados como seguros, y han sido consumidos por la humanidad durante milenios, de modo que la bioconservación constituye una alternativa natural para la conservación de alimentos.

Tomando en cuenta la necesidad de la industria cárnica de encontrar alternativas a los conservantes tradicionales, la empresa colaboradora de este proyecto y la Universitat Politècnica de València, han estado trabajando en los últimos años en el estudio de las posibilidades tecnológicas de producir bioconservantes a partir de dos cepas de bacterias ácido-lácticas, las cuales han sido aisladas y comercializadas como cultivos iniciadores (starters) por dicha empresa.

Además de cultivos iniciadores, la empresa colaboradora comercializa una amplia gama de ingredientes, como formulas completas (para preparados cárnicos, productos cocidos o curados), saborizantes o especias. Al ofrecer bioconservantes para productos cárnicos, la empresa ampliaría la oferta de productos, contando con alternativas innovadoras diferentes a los conservantes químicos. Desde el punto de vista de su comercialización, los bioconservantes podrían estar disponibles como producto en polvo, incorporados junto otros ingredientes o podrían venderse por separado.

Esta tesis doctoral describe las etapas de caracterización de los cultivos starter, el desarrollo de posibles bioconservantes y su aplicación en productos cárnicos.

REFERENCIAS

- Aral. (2016). La producción de carne en España aumenta un 7,7% en 2015. Recuperado 15 de julio de 2016, a partir de <http://www.revistaaral.com/es/notices/2016/04/anice-produccion-carne-espana-aumenta-7-7-2015-76438.php#.V4jyYfmLSM8>
- Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S., & Vignolo, G. (2008). A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat science*, 79(3), 483-99.
- Federación Española de Industrias de la Alimentación y Bebidas (FIAB). (s. f.). Marco estratégico para la industria de alimentación y bebidas. Recuperado 20 de julio de 2016, a partir de <http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/marco-estrategico/>
- Reglamento (UE) N° 1129/2011 de la comisión de 11 de noviembre de 2011 por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) N° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión, Diario Oficial de la Unión Europea 1-177 (2011).
- Riesco, S., Picaza, N., & Barañano, L. (2016). El consumo alimentario en Europa horizonte 2020, en 8 tendencias. Recuperado 16 de julio de 2016, a partir de <https://issuu.com/aztitecnalia/dochttp://issuu.com/aztitecnalia/docs/eatendencias/3?e=0>

CAPÍTULO I

Introducción

I. INTRODUCCIÓN

I.1 ALTERACIÓN DE LA CARNE Y DE LOS PRODUCTOS CÁRNICOS

I.1.1 Aspectos que condicionan el crecimiento microbiano

I.1.1.1 Factores intrínsecos y extrínsecos

La alteración de la carne fresca depende de la interacción de diversos factores que condicionan el crecimiento microbiano (Figura I-1). Entre las características intrínsecas de la carne que favorecen el desarrollo de microorganismos, se encuentran su alta actividad de agua, pH favorable y alto contenido de nutrientes. Aunque es inevitable la presencia de microorganismos alterantes, estos deben mantenerse en niveles aceptables, de manera que se pueda evitar o retrasar el proceso de alteración. Esto se consigue aplicando buenas prácticas de higiene que garanticen una contaminación microbiana mínima durante el procesado (despiece, troceado, envasado, etc.) y controlando los factores extrínsecos que regulan el crecimiento microbiano: la temperatura y la composición de la atmósfera (Sinell, 1994).

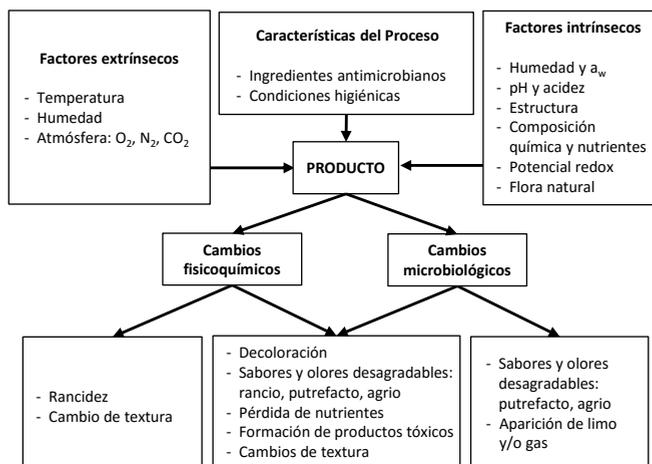


Figura I-1. Factores que afectan el crecimiento microbiano y cambios que se producen en la carne debidos a la alteración (Food and Drug Administration, 2013; Huis in't Veld, 1996)

Sensorialmente, la percepción de la alteración de la carne depende de la presencia de compuestos orgánicos volátiles indeseables (ácidos orgánicos, aldehídos y cetonas, entre otros) a determinadas concentraciones, que son generados por grupos microbianos específicos. El proceso de alteración está por tanto ligado al desarrollo de dichos microorganismos y a la producción de estos compuestos, que depende de la carga inicial, de las condiciones de envasado/almacenamiento y la manera en que los diferentes grupos microbianos interactúan entre sí (Casaburi, Piombino, Nychas, Villani, & Ercolini, 2015). Además de las transformaciones físicas y químicas que se producen en la carne como consecuencia del desarrollo de microorganismos, también ocurren reacciones enzimáticas y no enzimáticas que contribuyen al proceso de alteración (por ejemplo la decoloración) y que son dependientes de sus características bioquímicas (Remenant, Jaffrès, Dousset, Pilet, & Zagorec, 2015).

Después del sacrificio la canal se contamina fácilmente con bacterias procedentes de la piel, los intestinos, las heces, el suelo, el aire, el agua, las superficies de trabajo o los manipuladores, alcanzando niveles de $10^2 - 10^4$ ufc/cm² (Russo, Ercolini, Mauriello, & Villani, 2006). El procesado posterior de la carne modifica su flora microbiana, ya que se producen cambios en sus propiedades que pueden favorecer o perjudicar a los diferentes grupos de microorganismos presentes. Por ejemplo, en el picado de la carne se liberan nutrientes que se encuentran en las fibras celulares, y que de este modo pueden ser utilizados por las bacterias. Además, los microorganismos aerobios que normalmente se encontrarían sólo en la superficie, como *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Moraxella*, se dispersan por todo el producto (Nychas, Marshall, & Sofos, 2007). Por otro lado, el desarrollo de determinados microorganismos se favorece por el aumento de potencial redox que se produce tras el picado (de -150 en el músculo maduro a +225 en la carne picada) (Sinell, 1994).

El pH es un factor intrínseco fundamental que regula el crecimiento microbiano, ya que afecta las reacciones enzimáticas y el metabolismo. El valor óptimo para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos se encuentra entre 6,6 y 7,5 (Knox, van Laack, &

Davidson, 2008). En la carne, el valor inicial del pH depende de una variedad de factores, como la alimentación del animal, el desarrollo del rigor mortis en la canal y el procesado al que ha sido sometida (Koutsoumanis, Stamatiou, Skandamis, & Nychas, 2006). El valor óptimo del pH post-mortem se situaría entre 5,4 y 5,8. Cabe mencionar que el tejido adiposo, al tener un pH más alto, se descompone más rápidamente (Borch, Kant-Muermans, & Blixt, 1996).

En cuanto a la composición química de la carne, la concentración de glucosa juega un papel fundamental, ya que influye en el nivel de deterioro que se puede alcanzar y el tipo de compuestos indeseables que se generan durante la descomposición. El contenido de glucosa en la carne es cercano al 0,2% (Borch et al., 1996). Niveles bajos de este compuesto promueven un metabolismo basado en la degradación de las proteínas por parte de las pseudomonas, lo cual acelera la percepción sensorial de alteración (Koutsoumanis et al., 2006). La rapidez del deterioro está afectada, además, por la concentración de ácido láctico, compuestos nitrogenados y aminoácidos libres. Dependiendo de los microorganismos presentes y su afinidad por el oxígeno, estos compuestos son utilizados para generar catabolitos volátiles, como ácidos grasos, ésteres compuestos azufrados, cetonas, aldehídos, alcoholes y amoníaco, entre otros (Casaburi et al., 2015). Los primeros compuestos que se producen en condiciones aeróbicas suelen ser sulfuros y ésteres de metilo, debido principalmente, a la descomposición de aminoácidos. Normalmente, se considera que la carne se encuentra sensorialmente alterada cuando la población microbiana sobrepasa $8 \log \text{ UFC/cm}^2$ o cuando la concentración de glucosa/gluconato en la superficie se encuentra por debajo del nivel de detección (Nychas et al., 2007).

El deterioro microbiano de la carne es diferente según la especie animal. Por ejemplo, la carne de cerdo envasada al vacío se descompone más rápidamente que la de vacuno en las mismas condiciones de conservación, debido a que los niveles de glucógeno y glucosa disminuyen a una mayor velocidad en la carne de cerdo (Borch et al., 1996).

El comportamiento de los microorganismos en el proceso de alteración depende de otras características intrínsecas del alimento, como pueden ser la porosidad, las características viscoelásticas y estructurales (matriz), la capacidad de los nutrientes de difundirse, la distribución espacial de las bacterias y el estado fisiológico de las mismas (Skandamis & Nychas, 2012). En relación a esto, Wilson et al. (2002) plantean una descripción de la estructura del alimento en base a lo que denominan “microarquitecturas”, cada una de ellas con características propias (líquido, gel, emulsión o superficie), y que definen la manera en que los microorganismos pueden desarrollarse. Las características de estas regiones definen el crecimiento microbiano tanto en forma como en extensión. Afecta, además, la acumulación o difusión de metabolitos producidos por los microorganismos, los cuales pueden causar cambios relevantes en las propiedades del alimento o en su flora microbiana (por ejemplo, la disminución del pH debida a la acumulación de ácidos producidos por bacterias ácido-lácticas).

La temperatura es un parámetro extrínseco de gran importancia, ya que regula la duración de la fase de latencia, la velocidad máxima de crecimiento y la máxima densidad poblacional (Doulgeraki, Ercolini, Villani, & Nychas, 2012). Debe mantenerse entonces bajo un control riguroso que debe extenderse hasta la cadena de distribución (Cervený, Meyer, & Hall, 2010). Considerando que la mayoría de los microorganismos son mesófilos, es decir, su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 20 y 45°C (Madigan, Martinko, Stahl, & Clark, 2012), es suficiente mantener la carne a temperatura de refrigeración (~4°C) para inhibir su crecimiento. Sin embargo, algunos microorganismos alterantes son psicrotolerantes, lo cual quiere decir que a pesar de que tienen una temperatura óptima de crecimiento sobre los 20°C, son capaces de crecer en refrigeración (Madigan et al., 2012), siendo este el caso de las pseudomonas, *Brochothrix thermosphacta* y algunas enterobacterias. Por otro lado, mantener el producto refrigerado evitaría el crecimiento de patógenos como *Escherichia coli* O157:H7 o *Staphylococcus aureus* cuyos rangos de temperatura de crecimiento se encuentran entre 8 - 45°C y 6 - 48°C, respectivamente (Palumbo, Call, Schultz, & Williams, 1995; Schelin et al., 2011).

La composición de la atmósfera selecciona los microorganismos que pueden desarrollarse en base a su metabolismo aeróbico o anaeróbico. En este principio se basa el envasado en atmósfera modificada (MAP) como técnica para frenar el crecimiento de determinados microorganismos alterantes, gracias a la incorporación de concentraciones variables de N_2 , O_2 y CO_2 en el envase. En general, con el uso de MAP se busca reducir el desarrollo de microorganismos aerobios de crecimiento rápido como las pseudomonas, aunque se desarrollen mejor otros microorganismos alterantes como *Brochothrix thermosphacta* y las bacterias ácido-lácticas (BAL), cuyo crecimiento en condiciones de refrigeración es más lento (Doulgeraki et al., 2012; Saucier, Gendron, & Gariépy, 2000). En el caso de los microorganismos anaerobios facultativos, su capacidad de crecer en atmósferas con concentraciones variables de O_2 va acompañada de cambios en su metabolismo y en los productos que generan. Así, los distintos compuestos volátiles que aparecen en la alteración de la carne dependen de la disponibilidad de oxígeno. Tal es el caso de muchas BAL y *Brochothrix thermosphacta*, que en condiciones anaeróbicas pueden producir ácido acético (Casaburi, De Filippis, Villani, & Ercolini, 2014; Casaburi et al., 2015), cuyo olor pungente característico es indeseable en el producto. Otra ventaja de usar MAP reside en el poder antimicrobiano del CO_2 , dado que afecta la permeabilidad de las células, produciendo cambios en el pH e inhibición de la actividad enzimática (La Storia, Ferrocino, Torrieri, Di Monaco, & Mauriello, 2012).

1.1.1.2 Interacción entre microorganismos

Para determinar la vida útil de los alimentos, normalmente se considera el efecto del pH, la temperatura, la actividad de agua, las condiciones redox y la concentración de nutrientes. Pero además de estos factores, se debe contemplar que existen interacciones entre los grupos microbianos que afectan su metabolismo y por tanto el proceso de alteración. Gram et al. (2002) exponen tres mecanismos: el antagónico, la metabiosis y la comunicación entre células.

Un efecto antagónico común, ocurre cuando el pH de la carne disminuye debido a la acumulación de ácidos producidos por bacterias ácido-lácticas (BAL). Sólo los

microorganismos adaptados para crecer en un entorno con un pH acidificado, serán capaces de desarrollarse o lo harán más rápidamente que el resto. Otros microorganismos (incluyendo las BAL) son capaces de producir bacteriocinas capaces de inhibir el crecimiento microbiano. Algunas bacterias pueden producir amoníaco y trimetilamina, los cuales son tóxicos para otros microorganismos, mientras que otras son capaces de producir antibióticos (Gram et al., 2002). Otro efecto antagónico se genera cuando los microorganismos compiten por algún nutriente esencial escaso. Por ejemplo, las *Pseudomonas* y *Shewanella putrefaciens* son capaces de secuestrar el hierro a través de producción de sideróforos, evitando así que otros microorganismos puedan utilizarlo (Gram, 1993; Gram et al., 2002).

La metabiosis se produce cuando un microorganismo es capaz de generar condiciones que favorecen el crecimiento de otro, por ejemplo a través del consumo de oxígeno (generando condiciones para el crecimiento de anaerobios) o mediante la producción de sustancias utilizables como sustrato por otro microorganismo. Esto podría generar un efecto sinérgico entre microorganismos alterantes, aumentando así el nivel de deterioro del producto (Remenant et al., 2015). Un caso concreto se produce cuando se desarrolla el *Streptococcus faecalis*, que al consumir oxígeno, permite el desarrollo en el seno de la carne del microorganismo patógeno anaeróbico *Clostridium perfringens* (Sinell, 1994). Por otra parte, a través de la metabiosis, más allá de impulsar el crecimiento de otras bacterias, se puede llegar a promover la generación de compuestos indeseables por parte de las bacterias alterantes. Este es el caso de algunas cepas de BAL capaces de degradar la arginina a ornitina, la cual es utilizada por *Enterobacteriaceae* para la formación de putrescina (Gram et al., 2002).

Los mecanismos de comunicación entre células involucran la producción de compuestos que sirven de señal para regular distintas características fenotípicas como la producción de factores de virulencia, movilidad o la formación de biofilms. Este fenómeno se denomina como “quorum sensing” (QS). Los compuestos más importantes en esta comunicación, específicamente entre las bacterias Gram negativas, son las N-acil-

homoserina-lactonas (AHL). En algunos estudios se ha encontrado que en los procesos de descomposición de los alimentos existe una relación entre las AHL y el nivel de deterioro (Gram et al., 2002), dado que muchas enzimas extracelulares que intervienen en la alteración de los alimentos estarían reguladas por QS (Skandamis & Nychas, 2012).

I.1.2 La “tecnología de los obstáculos” como estrategia para la conservación de productos cárnicos

El conocimiento de las características de crecimiento de los microorganismos alterantes o patógenos permite seleccionar y adecuar las técnicas de conservación para prolongar la vida útil y garantizar la seguridad del producto cárnico. En general, suelen usarse técnicas combinadas de conservación, como por ejemplo la refrigeración con el envasado en atmósfera modificada (MAP) y/o con aplicación de tratamientos térmicos. En algunos casos se recurre a la adición de determinados ingredientes como sal, fosfatos, sulfitos o nitritos/nitratos (que en ciertos productos cumplen además una función tecnológica). Las especias, utilizadas con una finalidad sensorial, poseen además un efecto antimicrobiano (Brul & Coote, 1999).

La aplicación conjunta de diferentes técnicas de conservación suele fundamentarse en la extensión de la vida útil que se consigue al combinarlas. A esto hace referencia la “tecnología de los obstáculos”, que aplicada de forma estratégica (“conservación multi-objetivo”) permite conservar el alimento manteniendo su estabilidad y atributos sensoriales y nutricionales. Se basa en la modificación conjunta de diferentes variables que regulan el crecimiento microbiano, como la homeostasis, el potencial redox, las reacciones enzimáticas, entre otros (Leistner, 2000).

I.1.3 Microorganismos alterantes de la carne

El desarrollo microbiano en la carne depende de las condiciones de almacenamiento y de la asociación que se produce entre los microorganismos. En base a esto, Doulgeraki

et al. (2012) proponen dos situaciones que definirían el deterioro del producto cárnico, en base a la prevalencia de determinadas poblaciones microbianas. La primera, se produciría cuando dominan los microorganismos anaerobios facultativos o los anaerobios Gram positivos, como en la carne almacenada en MAP o con baja disponibilidad de O₂. La segunda, se establecería cuando dominan las bacterias aerobias o las anaerobias facultativas Gram negativas, como en la carne almacenada aeróbicamente o en alta concentración de O₂. En función de la situación que se haya producido, el alimento atravesaría por cambios diferentes en sus propiedades sensoriales durante el almacenamiento, lo cual repercutiría en el tiempo de vida útil alcanzado.

Algunos autores (Doulgeraki, Paramithiotis, Kagkli, & Nychas, 2010; Ercolini, Russo, Torrieri, Masi, & Villani, 2006; Koutsoumanis et al., 2006) utilizan el término “organismo específico de alteración” (SSO, siglas en inglés) para referirse a aquellos microorganismos pertenecientes a la flora natural del alimento que son responsables del proceso de alteración, como las bacterias ácido-lácticas y las pseudomonas.

1.1.3.1 Bacterias ácido-lácticas

Las bacterias ácido-lácticas son microorganismos anaerobios facultativos que pueden convertirse en la flora dominante de la carne envasada a vacío o en MAP (Knox et al., 2008; Mastromatteo, Lucera, Sinigaglia, & Corbo, 2009). Toleran el CO₂ mejor que las pseudomonas o enterobacterias, por lo cual, su crecimiento está favorecido en MAP en comparación con estos microorganismos. Las BAL son capaces de tolerar pH bajos dado que poseen mecanismos que regulan el pH intracelular (Hutkins & Nannen, 1993; Koutsoumanis et al., 2006), siendo esto una ventaja para crecer en alimentos con pH ligeramente acidificado.

La glucosa presente en la carne es de gran importancia en la definición del metabolismo microbiano, como se comentó en el apartado 1.1.1.1. En función de su metabolismo, las BAL pueden clasificarse en dos grupos: homofermentativas y heterofermentativas. Las primeras producen básicamente ácido láctico a partir de las

hexosas (como la glucosa) (Zúñiga, Pardo, & Ferrer, 1993). Las heterofermentativas en cambio, pueden ser heterofermentativas obligadas, que producen ácido láctico, acético, etanol y CO₂, o heterofermentativas facultativas, las cuales pueden adoptar un metabolismo homofermentativo o heterofermentativo en función del contenido de glucosa: cuando este azúcar se encuentra presente, se establece la ruta homofermentativa (producción de ácido láctico), mientras que si este azúcar se encuentra en cantidades limitadas, utilizarían el metabolismo heterofermentativo (Calasso & Gobbetti, 2011; Casaburi et al., 2015). En consecuencia, el contenido de glucosa afectaría el perfil de compuestos volátiles producidos por las BAL durante la descomposición de la carne ya que condicionaría su metabolismo.

La composición de la atmósfera también influye en las vías metabólicas utilizada por estos microorganismos, dado que en condiciones aeróbicas con baja concentración de glucosa, muchas BAL pueden oxidar el lactato a acetato, el cual es indeseable debido a su olor penetrante (Casaburi et al., 2015). Por otra parte, puede ocurrir una sucesión de especies de BAL durante el almacenamiento de la carne que estaría afectada por la composición de la atmósfera. En relación a esto, Doulgeraki et al. (2010) observaron que durante el almacenamiento de carne picada de vacuno se produjo una sustitución de la población dominante de BAL heterofermentativas a homofermentativas.

Entre las especies más importantes de BAL encontradas en la carne están *Lactobacillus curvatus*, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Carnobacterium divergens*, *Lactobacillus fuchuensis* o *Lactobacillus sakei* (Doulgeraki et al., 2012). En la alteración de la carne cruda refrigerada, comúnmente se encuentran implicados *Lactobacillus spp.*, *Carnobacterium spp.* y *Leuconostoc spp.* (Doulgeraki et al., 2012; Labadie, 1999).

En el caso de los productos curados/fermentados, el pH u otros métodos de conservación previenen el crecimiento de la microbiota alterante normal, haciendo posible que puedan alterarse por BAL. La flora típica ácido-láctica en estos productos se identifica como *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus spp.* (Huis in't Veld, 1996).

En general, el crecimiento de bacterias ácido-lácticas no se percibe de forma tan negativa como el de otros microorganismos, ya que sensorialmente producen un aroma agrio que es preferible a los olores putrefactos que generan otros microorganismos (Saucier et al., 2000). Sin embargo, algunas BAL, como *Lactobacillus sakei*, pueden producir sulfuro de hidrógeno a partir de la cisteína cuando existe baja concentración de glucosa, o baja concentración de O₂, lo cual puede ocurrir en la carne (Saucier et al., 2000). Además, *L. sakei* y *Leuconostoc* han sido descritos como productores de limo superficial en carnes procesadas (Hugas, 1998). El crecimiento de BAL heterofermentativas podría también producir agujeros debido a la formación de CO₂ (Hugas, 1998).

Una característica importante de las BAL es su efecto antagonista sobre diferentes microorganismos alterantes como *Carnobacterium spp.* y *B. thermosphacta*, o patógenos como *L. monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, entre otros (Liu, Guo, & Li, 2006; Zhang, Baranyi, & Tamplin, 2015). El efecto antagonista de las BAL se basa en su capacidad de producir diversas sustancias antimicrobianas (dependiendo del género y la especie), como ácidos orgánicos, bacteriocinas, reuterina, peróxido de hidrógeno y CO₂, entre otros. Probablemente el efecto más importante se deba a la producción de ácidos, cuyo poder antimicrobiano viene dado por la disminución del pH y por el efecto de la forma no disociada del ácido (Adams & Nicolaidis, 1997).

1.1.3.2 *Pseudomonas spp.*

Las pseudomonas suelen ser microorganismos predominantes en las carnes refrigeradas, especialmente en condiciones aeróbicas. Debido a su rápido crecimiento a temperaturas de refrigeración, pueden constituir el 50 – 90% de la población total de microorganismos (Doulgeraki et al., 2012; Saucier et al., 2000). Su desarrollo se restringiría utilizando MAP, ya que el CO₂ inhibiría su desarrollo (Doulgeraki et al., 2012; Esmer, Irkin, Degirmencioglu, & Degirmencioglu, 2011). Entre las especies más comunes aisladas en la carne alterada se encuentran *P. fragi*, *P. lundensis* y *P. putida* (Doulgeraki et al., 2012).

Las pseudomonas se caracterizan por producir olores desagradables debido a la proteólisis y al metabolismo de aminoácidos (Esmer et al., 2011). Por ello, según Koutsoumanis et al. (2008), el crecimiento de pseudomonas podría considerarse como un indicador del nivel de deterioro de carne almacenada aeróbicamente.

Las pseudomonas podrían ejercer un efecto antagónico importante sobre otras bacterias presentes en la carne. Se ha visto que algunas cepas tienen capacidad de producir diversos compuestos antimicrobianos (enzimas, lipopéptidos cíclicos, antibióticos, 2,4-diacetilfloroglucinol, entre otros) (Gram, 1993; Zhang et al., 2015). Además, como se ha comentado en el apartado I.1.1.2, algunas cepas de pseudomonas pueden producir sideróforos para la captación del hierro (además poseen efecto antibiótico), haciéndolo inutilizable para otros microorganismos (Gram, 1993).

I.1.3.3 Brochothrix thermosphacta

B. thermosphacta es un microorganismo asociado a la descomposición de la carne fresca (Ercolini et al., 2006; Russo et al., 2006). Tiene la capacidad de crecer tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Esta característica hace que pueda prevalecer en el alimento a concentraciones importantes en ambas situaciones. Papadopoulou, Doulgeraki, Botta, Cocolin, & Nychas (2012) encontraron que en condiciones aeróbicas el desarrollo de *B. thermosphacta* sólo había sido superado por las pseudomonas, mientras que en MAP se convirtió en el microorganismo dominante junto con las BAL. Por tanto, juega un papel relevante en la descomposición de la carne envasada con concentraciones importantes de CO₂ (Pin, García de Fernando, & Ordóñez, 2002), aunque con limitaciones, ya que en base a los resultados de Esmer et al. (2011), concentraciones de 50 o 70% de dicho gas inhibirían su crecimiento.

En condiciones aeróbicas o de baja concentración de O₂, *B. thermosphacta* puede producir acetoina (principalmente), los ácidos acético, isobutírico, isovalérico y láctico, dióxido de carbono, etanol y otros compuestos. En condiciones anaeróbicas, a partir de glucosa, produce ácido L-láctico y etanol, y sólo pequeñas cantidades de ácidos de cadena

corta. Por ello, es preferible que este microorganismo en la carne mantenga un metabolismo anaeróbico, dado que en este caso se producen menos compuestos volátiles desagradables (Pin et al., 2002). Por otro lado, se ha visto que algunas cepas pueden producir hidrolasas y degradar proteínas, lo cual contribuye a la alteración de la carne (Casaburi et al., 2014; Papadopoulou et al., 2012). Otros sustratos que pueden ser utilizados por este microorganismo en condiciones aeróbicas son ribosa, glicerol, glicerol-3-fosfato e inosina (Casaburi et al., 2014)

Desde el punto de vista sensorial, la alteración por parte de *B. thermosphacta* se caracteriza por la aparición de olores dulces-agrios desagradables, debido a los ácidos y en mayor grado a la acetoina, a la cual se le atribuye un aroma lácteo (Casaburi et al., 2014; Pin et al., 2002).

1.1.3.4 *Enterobacterias*

Al igual que como ocurre con otros grupos de microorganismos, en el caso de las enterobacterias, las diferentes especies que integran este grupo crecen a distintas temperaturas. Por ejemplo, Doulgeraki, Paramithiotis, & Nychas (2011) observaron que en carne picada de vacuno, *Serratia liquefaciens* dominaba a 0 - 5°C, mientras que *Hafnia alvei* lo hacía entre 10 y 15°C.

Las enterobacterias prevalecen en condiciones de refrigeración deficiente (10°C) (Saucier et al., 2000). Al utilizar MAP (CO₂ y N₂) se ha observado que el crecimiento de estos microorganismos se encuentra desfavorecido, aunque en menor grado que las pseudomonas (Borch et al., 1996; Langston, Altman, & Hotchkiss, 1993).

En la descomposición de la carne se han visto implicados los géneros *Serratia*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Proteus* y *Hafnia*. Entre las especies más importantes se encuentran *Serratia liquefaciens* (en carne almacenada en MAP) y *Hafnia alvei*, la cual es la enterobacteria mayormente encontrada en la carne, posiblemente debido a su capacidad de crecer a bajas temperaturas. *H. alvei* y *S. liquefaciens* son productoras de

putrescina y cadaverina, y además generan coloraciones verdosas (producción de H₂S), por lo cual su presencia es indeseable en la carne (Borch et al., 1996; Doulgeraki et al., 2011).

Otras especies importantes, encontradas en este caso en la carne picada son *Rahnella aquatilis* y *Citrobacter freundii* (Borch et al., 1996; Doulgeraki et al., 2011). Existen especies de enterobacterias que son patógenas, las cuales serán descritas más adelante.

1.1.3.5 Clostridios

Se han encontrado especies de *Clostridium* como causantes del hinchamiento de los envases de la carne envasada a vacío: *C. algidicarnis*, *C. algidixylanolyticum* y *C. putrefaciens* entre otros (Doulgeraki et al., 2012). Existen además clostridios patógenos, los cuales se mencionarán en el siguiente apartado.

1.1.4 Microorganismos patógenos en la carne

Como se ha comentado anteriormente, la carne ofrece un sustrato ideal para el desarrollo de microorganismos, incluyendo algunos patógenos. Las estrategias de conservación de los alimentos deben por ello asegurar que el crecimiento microbiano no represente un problema de seguridad alimentaria. En general, los criterios tecnológicos que se aplican para la extensión de la vida útil, evitando el crecimiento de microorganismos alterantes, pueden ser trasladados para mantener la inocuidad de los alimentos. En relación a esto, Calo-Mata et al. (2007), sostienen que en condiciones de abuso de temperatura, el deterioro del producto ocurre antes que la proliferación de patógenos. Sin embargo, los procesos de conservación en muchos casos deben estar dirigidos a eliminarlos, o bien a inhibir su crecimiento durante el procesamiento y la cadena de distribución. Baer, Miller, & Dilger (2013) hacen una extensa revisión de los microorganismos patógenos comúnmente encontrados en la carne de cerdo y las medidas de control para evitar su proliferación en diferentes etapas del proceso de producción. A

continuación, se explican brevemente las características de algunos de los microorganismos patógenos más importantes encontrados en productos cárnicos.

1.1.4.1 Listeria monocytogenes

Uno de los microorganismos patógenos más preocupantes es *Listeria monocytogenes*, responsable de la listeriosis. Aunque los casos reportados son esporádicos, esta enfermedad tiene una alta mortalidad (30%) (Winkowski, Crandall, & Montville, 1993). Puede producir meningitis y la muerte en neonatos, o abortos espontáneos en mujeres embarazadas que hayan consumido alimentos contaminados. En personas a dultas puede ser asintomática o cursar como una enfermedad leve, pero en personas inmunodeprimidas o ancianos puede generar una infección del sistema nervioso (como la meningitis). En los casos en los que se consume un alimento con una cantidad excepcionalmente alta de este microorganismo ($>10^7/g$) produce vómitos, diarrea, y algunas veces bacteriemia (European Commision: Health & Consumer Protection Directorate-General, 1999). Aunque raras veces los niveles de este microorganismo exceden los límites legales en alimentos listos para consumo en la Unión Europea (UE) (100 ufc/g, según el Reglamento (CE) Nº 2073/2005), datos recientes indican que los casos aumentaron en 2014, en comparación con los reportados en el año anterior (European Food Safety Authority (EFSA), 2015).

L. monocytogenes puede crecer a temperaturas entre 0 y 45°C, y es relativamente tolerante a la sal (hasta 28% w/v en periodos cortos), baja a_w y pH bajo, de modo que es difícil controlar su crecimiento. Además, puede encontrarse en una variedad de alimentos, especialmente los mínimamente procesados mantenidos en refrigeración. En estos, la flora bacteriana normal se encuentra inhibida, lo cual le permite crecer hasta alcanzar niveles peligrosos (Calo-Mata et al., 2007).

1.1.4.2 Campylobacter

Otro microorganismo patógeno de gran importancia en productos cárnicos (especialmente en pollo) es *Campylobacter jejuni*, el principal microorganismo del género

Campylobacter implicado en la campilobacteriosis. Esta bacteria crece mejor a temperaturas entre 37 – 42°C y sólo se multiplica a una concentración baja de oxígeno (inferior a la de la atmósfera). La enfermedad se caracteriza por producir calambres, diarrea y dolor abdominal durante unos días, rara vez con consecuencias graves (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2014). La campilobacteriosis es la enfermedad transmitida por alimentos más común en la UE desde el año 2005, con un incremento del 10% en el año 2014 en comparación con el año anterior (aunque dicho aumento puede deberse en parte a mejoras en los sistemas de detección) (EFSA, 2015).

1.1.4.3 *Enterobacterias*

La familia *Enterobacteriaceae*, además de incluir varios microorganismos alterantes comentados en el apartado 1.1.3.4, contiene algunos géneros y especies de microorganismos patógenos.

En general, las cepas de *Escherichia coli* son inofensivas, y habitan en los intestinos de animales y del hombre. Sin embargo, algunas son capaces de producir enfermedades, como la *E. coli* verotoxigénica (VTEC), comúnmente conocida como O157:H7 (CDC, 2015a), la cual es causante de colitis hemorrágica. La presencia de este microorganismo es de gran preocupación, debido a que la ingesta de solo algunas células puede producir infecciones severas (Lücke, 2000). Comúnmente, el origen de los brotes de esta enfermedad está asociado con el consumo de carne picada de vacuno (X. C. Meng, Stanton, Fitzgerald, Daly, & Ross, 2008). La *E. coli* O157:H7 cuenta con mecanismos de resistencia que le permiten sobrevivir a pH ácidos, de modo que, como muchos otros patógenos, puede sobrevivir al pH ácido del estómago, y por extensión, al de muchos alimentos. Por ello, se ha encontrado en brotes de enfermedad asociados al consumo de embutidos fermentados (Adams & Nicolaidis, 1997). El pH mínimo de crecimiento es 4,0-4,5 pero esto depende de la interacción del pH con otros factores (J. Meng, LeJeune, Zhao, & Doyle, 2007).

Otras enterobacterias patógenas son las salmonellas. Producen una enfermedad zoonótica conocida como salmonelosis, con más de 90.000 casos reportados cada año en

la UE (EFSA, 2014). En 2014 se produjo un ligero incremento de esta patología, aunque en parte se atribuye a la inclusión de reportes de más estados miembros (EFSA, 2015). La sintomatología se caracteriza por diarrea, fiebre y calambres abdominales, normalmente sin implicaciones graves. La enfermedad es producida por *Salmonella entérica*, generalmente por los serotipos Typhimurium y Enteritidis (CDC, 2015b).

1.1.4.4 Clostridios

En condiciones anaeróbicas en productos cárnicos, puede crecer *Clostridium perfringens*. Este se desarrolla cuando se produce un abuso de temperatura: por mantener el alimento sin refrigerar después de la cocción o porque se almacena a temperatura ambiente (temperaturas superiores a 12 °C). La enfermedad que produce se caracteriza por dolor abdominal y diarrea aguda después de 8-24 h de ingestión de una gran cantidad del microorganismo. En productos cárnicos se encuentran implicadas las carnes cocinadas o curadas (EFSA, 2005).

El *Clostridium botulinum*, causante del botulismo, normalmente se asocia a carnes curadas o fermentadas (EFSA, 2005). El envasado de la carne en condiciones de vacío o de baja concentración de O₂ puede favorecer su crecimiento, pero puede evitarse si se mantiene el producto en refrigeración (Nychas et al., 2007). La enfermedad puede originarse de dos formas: al consumir el alimento contaminado con alguna de las toxinas, o al ingerir el microorganismo, el cual se multiplica en el propio intestino y produce la toxina (EFSA, 2005).

1.2 LA BIOCONSERVACIÓN Y LAS BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS

El efecto antagónico entre microorganismos se conoce desde el siglo XIX en los inicios de la microbiología, y se ha vinculado a la actividad metabólica de las bacterias ácido-lácticas (BAL) (Stiles, 1996). La bioconservación se basa en la prolongación de la vida útil de los alimentos por medio de los compuestos antimicrobianos producidos por determinados microorganismos (fundamentalmente BAL), bien sea por su adición directa

o por la aplicación de sus metabolitos. Se trata entonces de un método de conservación natural o con componentes naturales, con un enorme potencial de aplicación en diferentes productos alimentarios. A través de la bioconservación, el producto podría ser etiquetado con alegaciones como “libre de” o “sin”, en aquellos casos en los que se pueda sustituir por completo los conservantes químicos tradicionales. La bioconservación en alimentos puede ser aplicada de cuatro maneras (Stiles, 1996):

- Añadiendo las cepas en el producto y favoreciendo su rápido crecimiento, de modo que eviten el desarrollo de microorganismos autóctonos potencialmente alterantes o patógenos.
- Agregando las sustancias antimicrobianas purificadas, producidas previamente por BAL en un medio de cultivo.
- Adicionando el concentrado de células de un cultivo protector.
- A través de la adición de BAL mesófilas, para que sirvan como un “sistema de seguridad” cuando se produce abuso de temperatura.

Las bacterias ácido-lácticas se caracterizan por producir una variedad de compuestos antimicrobianos, dependiendo de las condiciones del medio de crecimiento y de la cepa en concreto. Entre los compuestos que pueden producir se encuentran ácidos orgánicos (láctico, acético, fórmico, propiónico y butírico), etanol, ácidos grasos, acetoina, peróxido de hidrógeno, diacetilo, propionato, fenil-lactato, hidroxifenil-lactato, dipéptidos cíclicos, bacteriocinas, dióxido de carbono, entre otros (Calo-Mata et al., 2007; Reis, Paula, Casarotti, & Penna, 2012; Settanni & Corsetti, 2008).

Principalmente, la manera en que las bacterias ácido-lácticas eliminan o inhiben a la flora competidora es mediante la producción de ácido láctico, ácido acético y posiblemente bacteriocinas. Existen otros compuestos antimicrobianos producidos por las BAL que no son de interés en bioconservación de productos cárnicos, debido a que son producidos en bajas concentraciones, como es el caso de la reuterina. Otras sustancias afectan negativamente las propiedades sensoriales, como el peróxido de hidrógeno o el

diacetilo, mientras que otras acarrear problemas legales, como el ácido benzoico (Burgess, Rivas, McDonnell, & Duffy, 2008; Lücke, 2000). En la Tabla I-1 se resumen algunos de los compuestos de bajo peso molecular (se excluyen las bacteriocinas) producidos por BAL y su espectro antimicrobiano.

Tabla I-1. Compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular producidos por bacterias ácido lácticas (Šušković et al., 2010)

Compuesto	Microorganismo productor	Espectro antimicrobiano
Ácido láctico	Todas las BAL	Leva duras, bacterias Gram positivas y Gram negativas
Ácido acético	BAL heterofermentativas	Leva duras, bacterias Gram positivas y Gram negativas
Diacetilo Acetaldehído Acetoina	Varios géneros de BAL, como <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactobacillus</i> y <i>Pediococcus</i>	Leva duras, bacterias Gram positivas y Gram negativas
Peróxido de hidrógeno	Todas las BAL	Leva duras, bacterias Gram positivas y Gram negativas
Dióxido de carbono	BAL heterofermentativas	La mayoría de los grupos taxonómicos de microorganismos
Reuterina	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Hongos, protozoos, bacterias Gram positivas y Gram negativas
Reuteridina	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Bacterias Gram positivas
Péptidos bicíclicos	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus pentosus</i>	Hongos
Ácido 3-fenil-láctico Ácido 4-hidroxifenil-láctico	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus alimentarius</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> , <i>Lactobacillus hilgardii</i> , <i>Leuconostoc citreum</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Hongos
Ácidos grasos 3-hidroxi	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Hongos
Ácido benzoico Metilhidantoina Mevanlolactona	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Hongos Bacterias Gram negativas

I.2.1 Cultivos protectores

El crecimiento de cultivos protectores en la carne interfiere con el desarrollo de microorganismos alterantes y patógenos a través de varios mecanismos: la producción de compuestos antimicrobianos (como los señalados anteriormente, en la Tabla I-1) y la competencia por oxígeno, nutrientes o sitios de adhesión (Hugas, 1998).

Aunque se asume que la ingesta de BAL no representa ningún peligro para la salud, para utilizarlas como cultivos protectores o starter, debe tomarse en cuenta que no todas ellas poseen el status legal de GRAS (“Generally Recognised as Safe”) según la FDA (Food and Drug Administration) de EEUU, o de QPS (“Qualified Presumption of Safety”) por la EFSA (Talon & Leroy, 2011). Esto se debe a que algunas no cumplen con todos los criterios para su inclusión (taxonomía, familiaridad, patogenicidad y destino de uso). Por otro lado, una BAL no podría considerarse segura para uso alimentario si se ha visto implicada en procesos infecciosos (como el *Lactobacillus rhamnosus*, en raras ocasiones), aun cuando no se haya comprobado que su ingesta produce alguna enfermedad (European Food Safety Authority (EFSA), 2007).

En algunos casos, la utilización de BAL en alimentos representa una mejora en sus propiedades nutricionales o funcionales, como es el caso de los productos probióticos. En cualquier caso, es deseable que un cultivo protector cumpla con algunos de los siguientes requisitos (Holzapfel, Geisen, & Schillinger, 1995):

- No debe ser patógeno y además no debe producir sustancias que pudieran representar un problema para la salud, como aminos biógenos y toxinas.
- Poseer capacidad de adaptación al producto, de manera que pueda proveer una actividad protectora consistente, una actividad metabólica predecible y una actividad enzimática específica para un alimento determinado (ejemplo: nitrato reductasa o catalasa en la carne).
- Ser competitivos frente a microorganismos autóctonos del alimento.

- No ser productores de sustancias sensorialmente indeseables (ciertos ácidos, gas, limo y decoloraciones, entre otros).
- Funcionar como indicador en condiciones de abuso.

Debe hacerse la distinción entre un cultivo protector y un cultivo starter. En el caso de los starter, la producción de determinados compuestos y enzimas tienen una finalidad tecnológica. Si bien estas sustancias pueden servir para aumentar la vida útil del alimento, esto representa un efecto secundario. En cambio, en el caso de los cultivos protectores la aplicación de los microorganismos tiene como objetivo principal el efecto conservante (Holzapfel et al., 1995).

Los productos cárnicos que podrían ser tratados con cultivos protectores para aumentar su vida útil pueden ser la carne cruda o semi-procesada y ciertos productos pasteurizados envasados al vacío, como los fiambres (Lücke, 2000). En comparación con otros alimentos fermentados por BAL, como la leche y los vegetales, el crecimiento controlado de estos microorganismos en la carne hace que este sea prácticamente imperceptible desde el punto de vista sensorial, dada la capacidad amortiguadora de pH de la carne y su bajo contenido de carbohidratos (Stiles, 1996). No obstante debe tomarse en cuenta que aunque los productos metabólicos de las BAL tienen un efecto importante como bioconservantes, el crecimiento incontrolado de ciertas especies puede causar alteraciones en los productos (Hugas, 1998).

1.2.2 Ácidos orgánicos

1.2.2.1 Efecto antimicrobiano

Aunque las BAL pueden producir una variedad de sustancias antimicrobianas, se supone que su efecto inhibitorio se debe principalmente a la reducción del pH y a la presencia de la forma no disociada de los ácidos orgánicos (Adams & Nicolaidis, 1997). Los ácidos láctico y acético, en su forma no disociada tienen cierta solubilidad en lípidos, lo cual les permite difundirse a través de la membrana celular hacia el interior de la célula

(Adams & Nicolaidis, 1997; Holzapfel et al., 1995). En el citoplasma, al encontrar un pH más alto, se favorece la aparición de la forma disociada del ácido, lo cual aumenta la concentración de H⁺, disminuyendo el pH y liberando la forma aniónica del ácido (Adams & Nicolaidis, 1997). De esta forma se afectan los procesos metabólicos y de fosforilación (Calo-Mata et al., 2007; Holzapfel et al., 1995). Mani-López, García, & López-Malo (2012) hacen una revisión detallada del efecto de los ácidos orgánicos en el metabolismo de los microorganismos.

La toxicidad de los ácidos orgánicos depende de la identidad del ácido (Adams & Nicolaidis, 1997). Entre los ácidos orgánicos, el acético es el que posee mayor poder y amplitud inhibitoria, actuando sobre bacterias, levaduras y mohos. El ácido láctico posee menor poder antimicrobiano, lo cual puede explicarse en parte al valor de su constante de disociación ácida (pKa): en el caso del acético, su pKa es 4,87 mientras que el láctico es de 3,08, por lo cual a un pH de 4 el 85% en el caso del ácido acético se encuentra no disociado en comparación con el 11% del ácido láctico (de Freire Bastos & Ceotto, 2011). En mezclas de los ácidos láctico y acético se ha encontrado que el ácido láctico al ser el más fuerte, produce un descenso del pH que aumenta la proporción de la forma no disociada del ácido acético, de modo que potencia su efecto (Adams & Nicolaidis, 1997).

La concentración y el tipo de ácidos que producen las BAL dependen tanto de la especie como de la cepa, la composición del medio y las condiciones de crecimiento. El ácido láctico es el que se produce en mayor cantidad (Ammor, Tauveron, Dufour, & Chevallier, 2006).

Los ácidos orgánicos e inorgánicos tienen un poder antimicrobiano diferente, que depende tanto del pH del entorno, como de su concentración. Midolo, Lambert, Hull, Luo, & Grayson (1995) demostraron que el ácido láctico posee mayor poder de inhibición sobre *Helicobacter pylori*, que el ácido clorhídrico o el ácido acético. Para ilustrar el efecto de la forma no disociada del ácido, Holzapfel et al. (1995) cita la capacidad antimicrobiana del ácido láctico y del HCl sobre *Escherichia coli*. El primero, inhibió el crecimiento de dicho microorganismo a pH 5,1, mientras que el segundo lo hizo a pH 4,5.

En general, las bacterias Gram positivas son menos resistentes al efecto de los ácidos orgánicos ya que no poseen membrana externa, de manera que los ácidos orgánicos pueden penetrar más fácilmente hacia el interior de la célula (Brul & Coote, 1999). Sin embargo, estas bacterias pueden contar con mecanismos para sobreponerse al estrés de los ácidos. Por ejemplo, *L. monocytogenes* mantiene el pH intracelular expulsando H^+ , pero esto conlleva a un agotamiento de ATP, lo cual influye en la capacidad del microorganismo de sobrevivir indefinidamente bajo condiciones ácidas severas (pH 3,5) (Shabala, Lee, Cannesson, & Ross, 2008).

Al utilizar ácido láctico en conjunto con otros compuestos antimicrobianos, podría generarse un efecto sinérgico, ya que este compuesto es capaz de permeabilizar membranas, mejorando así el efecto letal de otras sustancias como las bacteriocinas (de Freire Bastos & Ceotto, 2011).

Aparte de los ácidos láctico y acético, se ha encontrado que el ácido propiónico posee un poder inhibitorio sobre hongos y bacterias (Calasso & Gobbetti, 2011).

1.2.2.2 Usos en productos cárnicos

La utilización de ácidos orgánicos o sus sales ha sido ampliamente documentada en diferentes estudios sobre la vida útil de productos cárnicos, en los que se ha demostrado su efectividad tanto en aves (Okolocha & Ellerbroek, 2005), cerdo (Baer et al., 2013; Dias, Ávila, & Schwan, 2011) y vacuno (Signorini, Ponce-Alquicira, & Guerrero-Legarreta, 2006). Los ácidos orgánicos en productos cárnicos tienen la denominación de GRAS (“Generally Recognised as Safe”) (Mani-López et al., 2012), y aunque no hay un límite para la mayoría de ellos en cuanto a la dosis diaria admitida, se debe considerar que producen cambios en el color y el sabor (Mani-López et al., 2012).

El tratamiento con ácido es efectivo para reducir la población microbiana de la superficie de la carne. Usualmente, se aplican a la canal después de retirar la piel (Burgess et al., 2008) Aunque algunas células sobrevivan al tratamiento, estas probablemente se

encuentren dañadas o estresadas, de modo que sus características de crecimiento o supervivencia estarían afectadas (Hwang et al., 2014). El uso de ácido láctico se encuentra autorizado para reducir la contaminación de superficie de canales, piezas y recortes de carne de bovino, a una concentración entre el 2 y 5% (Reglamento (UE) No 101/2013). Cuando se utiliza como descontaminante de la superficie de las canales, concentraciones del 3% no producen cambios en las propiedades sensoriales, al contrario de lo que puede suceder cuando se aplica directamente sobre cortes de carne o productos cárnicos (Burgess et al., 2008).

1.2.3 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos o proteínas de bajo peso molecular (normalmente menor a 10.000 Da) (Schillinger, Geisen, & Holzapfel, 1996) conformadas por 30 - 60 aminoácidos, y son sintetizadas en los ribosomas de las bacterias productoras (Settanni & Corsetti, 2008). La mayoría son moléculas catiónicas termoestables (Hugas, 1998). Se clasifican en tres grupos, Clase I (lantibióticos) entre las que se incluye la nisina, Clase II (no lantibióticos), como la pediocina PA-1 y Clase III (Chen & Hoover, 2003).

Las bacteriocinas poseen una actividad antimicrobiana variable, normalmente sobre especies estrechamente relacionadas, o inclusive sobre cepas de la misma especie productora. Otras bacteriocinas pueden actuar sobre otros géneros de microorganismos, especialmente Gram positivos (Schillinger et al., 1996), debido a que pueden desestabilizar los polímeros aniónicos de la pared celular (ácidos teicoico y lipoteicoico) (Zacharof & Lovitt, 2012). Por tanto, destacan por su actividad contra patógenos y alterantes Gram positivos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium botulinum* (Schillinger et al., 1996). Además, de su efecto sobre la pared celular, las bacteriocinas afectan la síntesis de ADN y proteínas (Calo-Mata et al., 2007). En el caso de las bacterias Gram negativas, al estar protegidas por la membrana externa esto previene que las bacteriocinas (y cualquier otra sustancia con peso molecular por encima de los 600 Da) pueda alcanzar la membrana citoplasmática. No obstante, las

bacterias Gram negativas pueden ser sensibilizadas a las bacteriocinas cuando se combina su uso con quelantes o tratamientos de conservación (Lücke, 2000). Por ello, su actividad antimicrobiana se asocia principalmente a los efectos que producen sobre las bacterias Gram positivas. Sin embargo, algunas bacteriocinas pueden afectar tanto a bacterias Gram positivas como Gram negativas, como las encontradas por Todorov y Dicks (2005), producidas por cepas de *L. plantarum* aisladas de melazas. Jamuna, Babusha, & Jeevaratnam (2005), observaron que las bacteriocinas producidas por *L. acidophilus* y *L. casei* poseían un amplio espectro antimicrobiano que incluía a bacterias Gram negativas, como *E. coli* y *Pseudomonas spp.* Otro caso, es el reportado por Gálvez, Maqueda, Martínez-Bueno y Valdivia (1989), quienes observaron que la enterocina AS-48 también podía afectar a bacterias Gram negativas, tales como algunas *E. coli*. Además, advirtieron que su rango de acción podía abarcar otras Gram negativas si se combinaba su aplicación con tratamientos desestabilizadores la membrana celular.

Las bacteriocinas de mayor interés son aquellas producidas por las BAL, dado que estos microorganismos son considerados como seguros. Por tanto, cualquier antimicrobiano que produzcan se podría calificar como un aditivo natural (Adams & Nicolaidis, 1997). Los alimentos que contienen BAL (como los productos fermentados) podrían contener bacteriocinas, por lo cuales es común ingerirlas a través de estos (Settanni & Corsetti, 2008). En cualquier caso, la naturaleza proteica de las bacteriocinas probablemente hace que sean inactivadas por proteasas en el tracto gastrointestinal (Hugas, 1998), por lo cual no serían asimiladas por el organismo.

Muchas géneros de BAL se conocen por incluir especies capaces de producir bacteriocinas: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Lactococcus*. Sin embargo, debe considerarse que la capacidad de producir bacteriocinas depende tanto de la especie como de la cepa (Calo-Mata et al., 2007). Aparte de las BAL, otras bacterias, incluidas las Gram negativas (como *E. coli*), pueden producir bacteriocinas, pero considerando que su espectro de acción es muy pequeño (actúan sobre especies muy

estrechamente relacionadas), tienen pocas posibilidades de explotarse como bioconservantes (Lücke, 2000).

En la aplicación de bacteriocinas de BAL en productos cárnicos se presenta una serie de desventajas. En primer lugar, el efecto antimicrobiano puede disminuir debido a que pueden ser inactivadas en el propio alimento. Por otra parte, las bacterias Gram negativas de la carne pueden resistir la acción de las bacteriocinas (como se comentó anteriormente), incluidas algunas patógenas como *Salmonella*, *Campilobacter*, *E. coli* enterohemorrágica o *Yersinia enterocolítica*. Sin embargo, pueden ofrecer protección frente a *L. monocytogenes*, al ser Gram positiva (Winkowski et al., 1993).

Cuando se utilizan cultivos protectores en productos cárnicos, debe considerarse que la producción *in situ* de bacteriocinas no puede equipararse a la que se consigue en medios de cultivo de laboratorio, debido a que en la carne, son muchos los factores que afectan el crecimiento microbiano (sección I.1.1) y por tanto los metabolitos producidos (Hugas, 1998).

Los ácidos orgánicos excretados por el cultivo protector podrían potenciar el efecto antimicrobiano de las bacteriocinas, ya que al aumentar la carga neta de estas (bajando el pH) se favorecería la translocación de las moléculas a través de la pared celular. Además, la solubilidad de las bacteriocinas podría aumentarse, facilitando así su difusión (Gálvez, Abriouel, López, & Ben Omar, 2007).

1.2.3.1 Factores que influyen en la producción de bacteriocinas

Las bacteriocinas han sido objeto de numerosos estudios que se centran en la optimización de las condiciones de fermentación para favorecer su producción. Son producidas por determinadas cepas en condiciones más o menos definidas, las cuales condicionan su concentración y estabilidad. En algunos casos, su producción se encuentra regulada por el crecimiento microbiano, pH y temperatura (Todorov et al., 2011).

El pH tiene una gran influencia en la producción de bacteriocinas. Por ejemplo, Todorov et al. (2011) observaron que la bacteriocina excretada por *L. plantarum* ST16Pa se producía a niveles más bajos cuando el pH inicial del medio era 4,6 en MRS (caldo de Man, Rogosa y Sharpe), en comparación con lo obtenido a pH 6,0–6,5. Según Abriouel, Valdivia, Martínez-Bueno, Maqueda, & Gálvez (2003), el pH óptimo varía mucho dependiendo de la bacteriocina, tomando un valor de 5,5 para la enterocina 1146, de 3,7 para la pediocina AcH o 5,0 para la sakacina. Otros autores han observado que mantener el pH controlado durante la fermentación puede aumentar la concentración de pediocina AcH, nisina, sakacina A o lacticina 3147 (Abriouel et al., 2003; Delgado et al., 2007; Morgan, Galvin, Ross, & Hill, 2001; Yang & Ray, 1994).

Por otro lado, la concentración de sal es un factor importante, dado que podría favorecer la liberación de las bacteriocinas adsorbidas a la superficie de las células (Leal-Sánchez, Jiménez-Díaz, Maldonado-Barragán, Garrido-Fernández, & Ruiz-Barba, 2002). Sin embargo, en algunos casos puede afectar negativamente la producción, como ha sido reportado por Delgado et al. (2007) para el caso de la producción de bacteriocinas de *L. plantarum* 17.b.

También es relevante la composición del medio de cultivo. Añadir factores limitantes del crecimiento como carbohidratos, nitrógeno o vitaminas, además de ajustar el pH del medio, puede incrementar la producción de bacteriocinas (Ghalfi, Benkerroum, Doguiet, Delvigne, & Thonart, 2007; Parente & Ricciardi, 1999; Todorov & Dicks, 2005). En algunos casos se necesita una cantidad óptima de un determinado ingrediente. Por ejemplo, de Vuyst y Vandamme (1992) observaron que una alta concentración de sacarosa (>40 g/L) afectaba negativamente la producción de nisina por *L. lactis subsp. lactis* NIZO22 186. Todorov et al. (2011) mencionan que utilizar determinadas concentraciones de KH_2PO_4 incrementaba la producción de la bacteriocina de *L. plantarum* ST16Pa. En el mismo estudio, se encontró que otros componentes como el citrato de amonio y las sales MgSO_4 y MnSO_4 ejercían también un efecto importante. Suele existir además un conjunto de condiciones óptimas (temperatura, pH, composición del medio, tamaño del inóculo,

tiempo de fermentación, entre otros) a las que se maximiza la producción de bacteriocinas. Por ejemplo, Leal-Sánchez et al. (2002) proponen una temperatura óptima de 22 – 27°C, 2,3 – 2,5%, de sal y un inóculo de 10^3 – 10^4 ufc/mL para favorecer la producción de bacteriocinas de *L. plantarum* LPCO10.

Se ha observado con cierta frecuencia, una correlación entre altos niveles de biomasa y alta producción de bacteriocinas (Abriouel et al., 2003; Delgado et al., 2007; Todorov et al., 2011). En algunos casos se ha visto que depende de la acumulación de péptidos inductores en el medio, por lo cual, controlar los factores que regulan su producción puede ser complejo (Abriouel et al., 2003).

1.2.3.2 Purificación

Las bacteriocinas son un grupo vasto y heterogéneo de sustancias, de modo que los métodos de purificación son diversos. En general, comprenden la obtención de un extracto crudo de bacteriocinas que se concentra y precipita con ácidos, sales, etanol y una mezcla de solventes. Posteriormente, se purifican empleando diferentes técnicas, como la cromatografía de gel, la ultrafiltración, la cromatografía iónica, la HPLC reversa, entre otras (Carolissen-Mackay, Arendse, & Hastings, 1997; Tagg, Dajani, & Wannamaker, 1976). Un problema común es la pérdida de actividad a mayor nivel de purificación debido a que se vuelven más inestables (Carolissen-Mackay et al., 1997; Tagg et al., 1976).

1.2.3.3 La nisina

La nisina es el primer polipéptido obtenido a partir de las BAL, específicamente del *Lactococcus lactis* (Settanni & Corsetti, 2008). Una de sus primeras aplicaciones (y de la biopreservación en general), se remonta a 1946, cuando Mattick y Hirsh demostraron que una cepa de *L. lactis* productora de nisina era capaz de destruir el bacilo de la tuberculosis en leche, mientras que otra cepa no productora de la bacteriocina, no lo hacía (Stiles, 1996).

La nisina fue reconocida en 1969 como conservante de alimentos por expertos de la FAO/WHO (Delves-Broughton, 2005). Esta bacteriocina ha sido utilizada con otros conservantes, como el sorbato/benzoato de potasio y la lisozima (Jamuna et al., 2005). Además, la nisina se ha aplicado junto a otras bacteriocinas, previniendo el crecimiento de microorganismos resistentes a ella y/o produciendo un efecto sinérgico, como el encontrado cuando se combina con la pediocina AcH (Kouakou, Ghalfi, Dortu, Evrard, & Thonart, 2010).

La producción de nisina se realiza normalmente a un pH constante, ubicándose el valor óptimo entre 5,5 y 6,8, dependiendo de la cepa productora, aunque existen diversas estrategias para mejorar su producción (Pongtharangkul & Demirci, 2006).

1.2.3.4 *Uso de bacteriocinas en productos cárnicos*

Las bacteriocinas pueden ser aplicadas de dos maneras, a través de la inoculación de la cepa productora en forma de cultivo protector, o añadiendo la bacteriocina previamente producida en un medio de fermentación, bien sea en forma cruda, purificada o semi-purificada (Ananou et al., 2005).

La aplicación de bacteriocinas a través de cultivos protectores elimina la necesidad de purificarlas, reduciendo costes de producción (Garcha & Natt, 2012). Maragkoudakis et al. (2009), encontraron que las BAL identificadas como *E. faecium* PCD71 y *L. fermentum* ACA-DC179 redujeron efectivamente el crecimiento en carne de pollo de *L. monocytogenes* y *S. enteritidis*, respectivamente. Winkowski et al. (1993), encontraron un efecto antimicrobiano de *L. bavancus* MN sobre *L. monocytogenes* en carne envasada a vacío en refrigeración.

A diferencia de los productos lácteos, el uso de bacteriocinas en la carne se ha visto limitado. La estructura de la carne dificulta que se distribuyan de forma homogénea (Chen & Hoover, 2003). Su efectividad puede estar afectada por la unión con componentes del alimento (partículas de grasa o la superficie de las proteínas) o con ciertos aditivos

(aceites); además de que pueden ser inactivadas por oxidación o por la acción de proteasas (Settanni & Corsetti, 2008).

Por otra parte el elevado pH de la carne afecta negativamente la estabilidad y efectividad de las bacteriocinas, tomando en cuenta que su actividad mejora a valores de pH bajos (Clase I y Clase II) (Chen & Hoover, 2003). Por ejemplo, el efecto antimicrobiano de la nisina se reduce sustancialmente a un pH superior a 5,0 (como el encontrado en la carne), por lo cual solo se utiliza en determinados productos cárnicos y a concentraciones de 250 µg/g (recomendable) (Ananou et al., 2010). Por ello, en algunos casos las dosis necesarias para lograr su efectividad no son económicamente rentables y exceden la dosis diaria aceptable de 100 g/día (persona de 60 kg) (Hugas, 1998). Otra desventaja de la nisina, es que no es efectiva sobre bacterias Gram negativas (Ananou et al., 2010), a menos que se utilicen altas cantidades (Todorov & Dicks, 2005). Adicionalmente, mientras mayor sea la concentración de microorganismos, más nisina se requiere añadir (Delves-Broughton, 2005).

En las carnes curadas se ha intentado sustituir parcialmente los nitritos por nisina, pero solo concentraciones altas y económicamente inviables, lograron controlar el crecimiento de *C. botulinum*. Otras aplicaciones con mejores resultados han sido su incorporación en los preparados (mix) de salchichas (1,25-6,25 mg/kg) o sumergiendo la salchicha cocida en una solución de nisina (5,0-25 mg/L) (Delves-Broughton, 2005). Por otra parte, Andrés-Bello, De Jesús, García-Segovia, Pagán-Moreno, & Martínez-Monzó (2015), lograron una reducción de los recuentos de aerobios mesófilos y *Enterobacteriaceae* al aplicar una solución de 2 mg/mL de nisina en filetes de dorada (*Sparus aurata*) mediante impregnación a vacío. Por su parte, la pediocina PA-1 aplicada en carne de pollo cruda, logró disminuir sustancialmente los recuentos de *L. monocytogenes* (de Freire Bastos & Ceotto, 2011).

En la bioconservación con bacteriocinas se debe tomar en cuenta, además, que existen bacterias que pueden desarrollar resistencia a las bacteriocinas, puesto que son capaces de inactivarlas por medio de enzimas (Benkerroum, Oubel, Zahar, Dlia, & Filali-Maltouf,

2000). Por ello, es conveniente la aplicación combinada con otros métodos de conservación (“obstáculos”) para prevenir que los patógenos resistentes puedan crecer. Por ejemplo, cuando se utilizan cultivos protectores, la producción de ácido láctico junto con bacteriocinas sería deseable (Abee, Krockel, & Hill, 1995) debido a los efectos beneficiosos del ácido láctico por su capacidad antimicrobiana y porque la disminución del pH favorecería la efectividad de las bacteriocinas, como se comentó anteriormente.

I.2.4 Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos son generalmente cadenas cortas catiónicas, producidas por animales y plantas, que tienen el potencial de inactivar bacterias, hongos, virus y protozoos. Se cree que su actividad antimicrobiana se debe a que los péptidos son atraídos por los fosfolípidos (negativamente cargados) de la membrana celular, desplazando los lípidos y alterando por tanto su estructura (Burgess et al., 2008).

En el caso de las bacterias ácido lácticas, se han aislado algunos dipéptidos cíclicos con capacidad antimicrobiana, como el cyclo(glicil-L-leucil) de *L. plantarum* VTT E-78076, o ciclo(L-Phe-L-Pro) y ciclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro), producidos por *L. plantarum* MiLAB 393 (Crowley, Mahony, & van Sinderen, 2013).

I.2.5 Bacteriófagos

Los bacteriófagos son virus que infectan y matan bacterias. Al reproducirse en el interior de las células, alteran sus procesos metabólicos. Atacan específicamente las células bacterianas, por lo cual pueden ser utilizados como bioconservantes (no atacan células de mamíferos). Se ha observado su poder antimicrobiano en diferentes productos cárnicos, sobre *Campilobacter jejuni*, *Salmonella* Enteritidis o *E. coli* O157:H7 (Burgess et al., 2008).

I.2.6 Peróxido de hidrógeno

Diversas BAL pueden producir peróxido de hidrógeno, generalmente en condiciones aeróbicas en cultivos agitados, aunque algunos microorganismos como *Lactobacillus delbrueckii* subs. *lactis* o *Lactobacillus acidophilus* pueden producirlo en condiciones estáticas (Villegas & Gilliland, 2006). El poder antimicrobiano del H₂O₂ se debe a que oxida los lípidos de la membrana, afectando su permeabilidad, y los grupos sulfhidrilo de muchas enzimas. Además, puede actuar como precursor en la formación de radicales libres, que pueden dañar el ADN (Ammor et al., 2006; Calo-Mata et al., 2007). Su efecto bactericida depende del pH y la temperatura (Brul & Coote, 1999).

El H₂O₂ producido por BAL puede afectar de forma significativa el crecimiento de *Pseudomonas spp.* y estafilococos (Holzapfel & Wood, 1995). Brashears, Siobhan, & Stanley (1998) determinaron que entre los compuestos antimicrobianos producido por *Lactobacillus lactis*, el peróxido de hidrógeno era el principal responsable en la inhibición de *E. coli* O157 en medio de cultivo. Adicionalmente, observaron un efecto letal sobre el mismo microorganismo diana en carne de pollo cruda.

I.2.7 Reuterina

La reuterina es una mezcla de las formas mono y diméricas del 3-hidroxiopropanaldehído, sintetizado a partir del glicerol por *Lactobacillus reuteri* (Calasso & Gobbetti, 2011). Posee actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram positivas como *L. monocytogenes* y Gram negativas como *E. coli* y *Salmonella* Tiphymurium, además de hongos y levaduras, como *Aspergillus flavus* y *Candida albicans* (Burgess et al., 2008; Crowley et al., 2013). Su poder antimicrobiano puede atribuirse a la reactividad del grupo aldehído con los grupos tiol de moléculas pequeñas y de proteínas, lo cual causa un estrés oxidativo a las células y por tanto su inhibición (Crowley et al., 2013). La reuterina es efectiva en un amplio rango de pH (2 - 8) y es resistente a enzimas proteolíticas y lipolíticas (Calasso & Gobbetti, 2011).

1.2.8 Diacetilo

Las BAL pueden producir diacetilo a partir de la fermentación del citrato, impartiendo un aroma a mantequilla a los productos fermentados, inclusive a concentraciones tan bajas como 2- 4 ppm. Su uso como bioconservante se encuentra limitado por esta característica, considerando que para lograr un efecto antimicrobiano relevante se necesitarían concentraciones mucho más altas (300 – 1000 ppm) (Helander, Von Wright, & Mattila-Sandholm, 1997). Puede afectar el crecimiento de microorganismos Gram positivos y Gram negativos, siendo más importante el efecto sobre estos últimos (Lanciotti, Patrignani, Bagnolini, Guerzoni, & Gardini, 2003). Su efecto antimicrobiano se debe a que interfiere con la utilización de la arginina (LeBlanc, De LeBlanc, De Souza Oliveira, & Todorov, 2014).

1.2.9 CO₂

El CO₂ es producido por BAL heterofermentativas a partir de las hexosas, y es tóxico para varias bacterias aerobias putrefactivas; sin embargo, puede promover el crecimiento de otros microorganismos (Holzapfel et al., 1995). Este gas puede reemplazar el oxígeno de la atmósfera, lo cual crea un entorno anaeróbico que inhibe la descarboxilación enzimática. Además, su acumulación en la membrana bilipídica puede afectar su permeabilidad (Ammor et al., 2006).

1.2.10 Otros compuestos

Existen otros compuestos antimicrobianos menos relevantes que pueden ser producidos por BAL. Entre ellos se pueden citar los ácidos grasos y sus hidroxilados, los cuales han demostrado tener un poder antifúngico, que se relaciona con la longitud de la cadena del ácido (siendo mejor para las cadenas más largas) (Crowley et al., 2013). Algunas cepas de *L. plantarum* son capaces de producir los ácidos 3-hidroxidecanoico, 2-hidroxil-4-metilpentanoico, entre otros, (Broberg, Jacobsson, Ström, & Schnürer, 2007).

Otro compuesto de interés es el ácido fenil-láctico, al cual se le ha dado gran importancia debido a que posee un amplio espectro antimicrobiano y antifúngico. La ausencia de toxicidad y de olor aparente de este compuesto, son algunas de sus características más relevantes de cara a su utilización como bioconservante en alimentos (Crowley et al., 2013).

Por último, algunas enzimas producidas por BAL, como lisozima o lisostafina, pueden proporcionarle al alimento una protección y estabilidad adicional frente al ataque de determinados grupos microbianos (Holzapfel et al., 1995)

I.3 BIOCONSERVANTES COMERCIALES

Probablemente el bioconservante comercial más popular sea la nisina, la única bacteriocina que se encuentra autorizada para su uso como conservante (sus características se explican en el apartado I.2.3.3). Es comercializada por DuPont Danisco (Itasca, Illinois, Estados Unidos) con el nombre de Nisaplin®. Este producto contiene 2,5% de nisina (el resto lo componen sólidos lácteos provenientes del medio de cultivo en el que es producida, a partir de *L. lactis*) (Delves-Broughton, 2005). La adición de nisina se encuentra autorizada en quesos, nata espesa (*clotted cream*) huevo líquido pasteurizado entre otros, según se indica en el Reglamento (UE) 1129/2011.

Las bacteriocinas también pueden ser aplicadas en alimentos sin purificarlas, a través de un producto fermentado que las contenga. Este es el caso de ALTA® 2351, comercializado por laboratorios Amerex S.A. (Colmenar Viejo, Madrid, España) (Laboratorios Amerex, 2016). Se trata de un producto en polvo, que contiene la pediocina PA-1 (Mills, Stanton, Hill, & Ross, 2011).

La empresa DuPont también elabora bioconservantes basados en antimicrobianos naturales procedentes de caldos de fermentación. Se trata de la gama de productos Microgard® (DuPont-Danisco, 2016), que abarca una serie de conservantes diseñados para

alimentos específicos (lácteos, productos cárnicos, panadería, etc.), con poder inhibitorio sobre bacterias Gram negativas, Gram positivas, mohos y levaduras. La misma empresa comercializa otros bioconservantes como Natamax® (contienen natamicina, un antifúngico producido por *Streptomyces natalensis*) o Avgard® (inhibitorio sobre patógenos Gram negativos en carne y pollo).

Por su parte, la empresa Biorigin (Sao Paulo, Brasil) fabrica una línea de ingredientes antimicrobianos a partir de dextrosa fermentada denominada Biogard®, con aplicación en diferentes alimentos, incluidos productos cárnicos. Son conservantes en polvo que contienen ácidos orgánicos y péptidos entre otros compuestos, con acción antimicrobiana sobre mohos.

Entre los bioconservantes disponibles en el mercado bajo la forma de cultivos protectores, se pueden citar Fargo 35®, Fargo 37® y Fargo 763®, producidos por Laboratorios Amerex. Están constituidos por cultivos de BAL, con aplicación en productos cárnicos. Fargo 35® y 37® son productos en polvo, mientras que Fargo 763® se comercializa congelado (Laboratorios Amerex, 2016).

I.4 LOS CULTIVOS STARTER

Los alimentos fermentados han sido consumidos durante milenios por la humanidad. En los pueblos primitivos, la fermentación producida por bacterias ácido-lácticas permitía conservar alimentos como la leche y la carne. Con el transcurrir del tiempo, se produjeron grandes avances en el campo de la microbiología, desde que Leeuwenhoek inventó el microscopio y describió por primera vez las bacterias en 1685. Posteriormente, gracias a los avances de Louis Pasteur en el siglo XIX, se comienza a investigar la relación entre los microorganismos y los cambios que producen en los alimentos. A lo largo de los años, el conocimiento que se ha generado en esta materia, ha contribuido a mejorar la calidad de los productos fermentados, ya que ha permitido reducir la aparición de las alteraciones que pueden ocurrir como consecuencia de una fermentación llevada a cabo de forma

descontrolada. Por ello, en la elaboración de embutidos fermentados, el aislamiento y/o aplicación de cepas específicas como cultivos bacterianos constituye una necesidad y una práctica habitual de trabajo, dado que permiten una calidad constante en el producto aun cuando los lotes de carne no sean uniformes (Schiffner, Hagedorn, & Opiel, 1978). Estas cepas bacterianas constituyen los llamados cultivos iniciadores o "starters". Son preparaciones de microorganismos vivos o de sus formas latentes, cuya actividad metabólica produce un efecto deseable en el alimento sujeto al proceso de fermentación (Vogel et al., 2011). Así, los cultivos starter permiten, además de la uniformidad del producto terminado, controlar el tiempo de fermentación, mejorar la conversión del sustrato, reducir los riesgos higiénicos, y posibilitan la elaboración de nuevos productos que no podrían obtenerse mediante una fermentación espontánea (Vogel et al., 2011).

En la fermentación de la carne con cultivos starter, existen dos grupos de microorganismos importantes: las BAL, como se comentó anteriormente, y los estafilococos coagulasa-negativos. Las BAL suelen estar presentes inicialmente en los productos cárnicos a concentraciones bajas, de 3-4 unidades logarítmicas, pero terminan convirtiéndose en la población microbiana dominante durante la fermentación (8 log ufc/g) (Talon & Leroy, 2011). En el proceso de producción del embutido se inocula una cantidad suficiente del starter, de modo que pueda sobrepasar e inhibir crecimiento de microorganismos indeseables (incluyendo patógenos como *L. monocytogenes*) (Sebranek, 2004). El dominio de las bacterias ácido-lácticas en embutidos fermentados se debe, en parte, al pH inicial de la mezcla de ingredientes (<5,8). En los alimentos fermentados, la producción de los ácidos láctico y/o acético por BAL, conlleva el descenso del pH, lo que a su vez genera la desnaturalización de las proteínas (reduciendo la capacidad de retención de agua y por tanto favoreciendo el secado), además de cambios en el sabor y la textura (Hugas, 1998; Schiffner et al., 1978). La producción de ácidos, el descenso del pH y la reducción de la actividad de agua, contribuyen además a una estabilización microbiana del producto (Hugas, 1998; Lücke, 2000). En el proceso de fermentación se produce poca cantidad de ácido acético, en comparación con la de ácido láctico, lo cual es deseable, ya

que de otra manera el producto sería inaceptable desde un punto de vista sensorial (Lücke, 2000).

Los cultivos starter suelen estar disponibles comercialmente como productos congelados o liofilizados. Para su aplicación se deben considerar ciertas precauciones en la descongelación o rehidratación para que mantengan su viabilidad.

El *Pediococcus acidilactici*, fue el primer cultivo starter desarrollado (en 1957, denominado entonces como *Pediococcus cerevesiae*) y es el más utilizado hoy en día en embutidos semi-secos. Otra BAL comúnmente utilizada es el *Lactobacillus plantarum*, a veces en conjunto con *P. acidilactici* (Sebraneck, 2004). Los cultivos comercializados pueden estar compuestos de diferentes cepas, cada una con una función tecnológica, conteniendo por ejemplo un acidificante (*Lactococcus* o *Pediococcus*) y una cepa que añade color y aroma (*Micrococcus* o *Staphylococcus*) (Wiberg, 2016).

Pediococcus acidilactici y *Pediococcus pentosaceus* constituyen los microorganismos starter preferidos en EEUU para embutidos fermentados. En Europa, los más utilizados son *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* y *Lactobacillus plantarum* (Hugas, 1998).

I.4.1 Proceso de producción de cultivos starter

En la producción de cultivos starter, se busca mantener las características metabólicas de la cepa evitando la aparición de mutantes (lo cual se logra al evitar hacer subcultivos o transferencias sucesivas, y manteniendo stocks). Tanto el método de producción como el de conservación, deben ser los apropiados para obtener la mayor concentración de células y la viabilidad de las mismas por un tiempo prolongado (Tamime & Robinson, 2007).

El proceso de producción de starters puede realizarse en modo continuo o discontinuo. En general, el proceso discontinuo es ideal para producciones pequeñas (no más de 20 litros) aunque requieren de más mano de obra (Schiffner et al., 1978). Este proceso consiste básicamente en realizar inoculaciones sucesivas de la cepa a producir en

volúmenes cada vez mayores, seguidas de una etapa de estabilización y finalmente el envasado. El proceso general se esquematiza en la Figura I-2.



Figura I-2. Proceso discontinuo de producción de cultivos starter

Se parte de un inóculo "stock" de la cepa a producir, que puede provenir de la colección de alguna institución o de un cultivo starter comercial. Puede estar en forma de crioviales, como liófilo o como cultivo congelado. El stock se propaga cultivando sucesivas veces en volúmenes cada vez mayores hasta obtener un crecimiento adecuado de la cepa. El número de veces que se propaga depende del método de conservación del cultivo stock, ya que cuando se parte de un cultivo liofilizado, suele obtenerse una fase de latencia larga, de modo que necesitaría mayor número de propagaciones (Tamime & Robinson, 2007). Así se obtiene el cultivo madre, el cual sirve para verificar el crecimiento del inóculo y para asegurarse de la pureza del medio de cultivo (Schiffner et al., 1978). A partir de este se puede preparar un cultivo intermedio (Tamime & Robinson, 2007) o inocular directamente el tanque de producción (Schiffner et al., 1978). Tanto el cultivo madre como el intermedio se pueden conservar de diversas maneras manteniendo su actividad: se pueden refrigerar (no más de una semana), o bien concentrarlos (separando las células del medio de cultivo usado por centrifugación) y estabilizarlos por congelación o secado. Esta forma es indicada para el almacenamiento a largo plazo (Tamime & Robinson, 2007).

La última etapa del proceso comprende la estabilización, que puede realizarse de diferentes formas (Tamime & Robinson, 2007):

- Refrigeración (medio líquido): El cultivo starter puede conservarse en refrigeración por un periodo no mayor a una semana, a una temperatura inferior a 10 °C. El éxito de este método de conservación depende de la acidez final del medio y de la velocidad de enfriamiento, entre otros factores.

- **Deshidratación:** Normalmente la precede un proceso de concentración de las células. Se puede deshidratar por atomización (no suele utilizarse) o por liofilización. En el caso de los cultivos liofilizados, para ayudar a mantener su viabilidad, se pueden utilizar diferentes sustancias antes de la deshidratación, tales como ácido ascórbico o glutamato de sodio, además de agentes crioprotectores como sacarosa o glucosa. El envasado puede realizarse en atmosfera normal, con nitrógeno o a vacío, dependiendo del microorganismo.
- **Congelación:** Se almacenan entre -20 y -40°C cuando no están concentrados, o a -80°C en el caso de estarlo. También se puede aplicar ultracongelación con nitrógeno líquido (-196°C). Al igual que en el caso de los cultivos liofilizados, se puede prolongar su actividad por más tiempo con la adición de crioprotectores como lactosa, extracto de levadura o glicerol. Normalmente se envasan en botellas de plástico. Antes de ser utilizados debe seguirse un procedimiento adecuado para su descongelación.

I.5 REFERENCIAS

- Abee, T., Krockel, L., & Hill, C. (1995). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International journal of food microbiology*, 28(2), 169-85.
- Abriouel, H., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., & Gálvez, A. (2003). A simple method for semi-preparative-scale production and recovery of enterocin AS-48 derived from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* A-48-32. *Journal of Microbiological Methods*, 55(3), 599-605.
- Adams, M. R., & Nicolaides, L. (1997). Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. *Food Control*, 8(5-6), 227-239.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., & Chevallier, I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. *Food Control*, 17(6), 454-461.
- Ananou, S., Garriga, M., Hugas, M., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., & Valdivia, E. (2005). Control of *Listeria monocytogenes* in model sausages by enterocin AS-48. *International journal of food microbiology*, 103(2), 179-90.
- Ananou, S., Muñoz, A., Martínez-Bueno, M., González-Tello, P., Gálvez, A., Maqueda, M., & Valdivia, E. (2010). Evaluation of an enterocin AS-48 enriched bioactive powder obtained by spray drying. *Food microbiology*, 27(1), 58-63.
- Andrés-Bello, A., De Jesús, C., García-Segovia, P., Pagán-Moreno, M. J., & Martínez-Monzó, J. (2015). Vacuum impregnation as a tool to introduce biopreservatives in gilthead sea bream fillets (*Sparus aurata*). *LWT - Food Science and Technology*, 60, 758-765.
- Baer, A. a., Miller, M. J., & Dilger, A. C. (2013). Pathogens of Interest to the Pork Industry: A Review of Research on Interventions to Assure Food Safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12, 183-217.
- Benkerroum, N., Oubel, H., Zahar, M., Dlia, S., & Filali-Maltouf, A. (2000). Isolation of a bacteriocin-

- producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan jben. *Journal of applied microbiology*, 89, 960-968.
- Borch, E., Kant-Muermans, M., & Blixt, Y. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International journal of food microbiology*, 33, 103-120.
- Brashears, M., Siobhan, R., & Stanley, G. (1998). Antagonistic action of cells of *Lactobacillus lactis* toward *Escherichia coli* O157: H7 on refrigerated raw chicken meat. *Journal of Food Protection*, 61(2), 166-170.
- Broberg, A., Jacobsson, K., Ström, K., & Schnürer, J. (2007). Metabolite profiles of lactic acid bacteria in grass silage. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(17), 5547-5552.
- Brul, S., & Coote, P. (1999). Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International journal of food microbiology*, 50(1-2), 1-17.
- Burgess, C. M., Rivas, L., McDonnell, M. J., & Duffy, G. (2008). Biocontrol of Pathogens in the Meat Chain. En F. Toldrá (Ed.), *Meat Biotechnology* (pp. 253-288). Springer Science & Business Media.
- Calasso, M., & Gobbetti, M. (2011). *Lactobacillus* spp. : Other Species, 3, 1507-1511.
- Calo-Mata, P., Arlindo, S., Boehme, K., Miguel, T., Pascoal, A., & Barros-Velazquez, J. (2007). Current Applications and Future Trends of Lactic Acid Bacteria and their Bacteriocins for the Biopreservation of Aquatic Food Products. *Food and Bioprocess Technology*, 1(1), 43-63.
- Carolissen-Mackay, V., Arendse, G., & Hastings, J. W. (1997). Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *International journal of food microbiology*, 34(1), 1-16.
- Casaburi, A., De Filippis, F., Villani, F., & Ercolini, D. (2014). Activities of strains of *Brochothrix thermosphacta* in vitro and in meat. *Food Research International*, 62, 366-374.
- Casaburi, A., Piombino, P., Nychas, G.-J., Villani, F., & Ercolini, D. (2015). Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage. *Food Microbiology*, 45(Part A), 83-102.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2014). *Camphylobacter*. Recuperado 4 de abril de

- 2016, a partir de <http://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/campylobacter/index.html>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2015a). E. coli. Recuperado 5 de abril de 2016, a partir de <http://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2015b). Salmonella. Recuperado 8 de abril de 2016, a partir de <http://www.cdc.gov/salmonella/general/index.html>
- Cervený, J., Meyer, J. D., & Hall, P. A. (2010). Microbiological spoilage of meat and poultry products. En W. H. Sperber & M. P. Doyle (Eds.), *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages* (pp. 69–86). Springer Science & Business Media.
- Chen, H., & Hoover, D. G. (2003). Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and food safety*, 2, 82-100.
- Commission Regulation (EC) N° 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. (2005). *Official Journal of the European Union*.
- Crowley, S., Mahony, J., & van Sinderen, D. (2013). Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 33(2), 93-109.
- de Freire Bastos, M. do C., & Ceotto, H. (2011). Bacterial Antimicrobial Peptides and Food Preservation. En M. Rai & M. Chikindas (Eds.), *Natural antimicrobials in food safety and quality* (pp. 62-76). CABI.
- de Vuyst, L., & Vandamme, E. J. (1992). Influence of carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *Journal of General*, 138(May), 571-578.
- Delgado, A., Arroyo López, F. N., Brito, D., Peres, C., Fevereiro, P., & Garrido-Fernández, A. (2007). Optimum bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* 17.2b requires a bsence of NaCl and apparently follows a mixed metabolite kinetics. *Journal of biotechnology*, 130(2), 193-201.
- Delves-Broughton, J. (2005). Nisin as a model food preservative. *Food Australia*, 57(12), 525-527.
- Dias, F. S., Ávila, C. L. D. S., & Schwan, R. F. (2011). In situ inhibition of *Escherichia coli* isolated from

fresh pork sausage by organic acids. *Journal of food science*, 76(9), M605-10.

Doulgeraki, A. I., Ercolini, D., Villani, F., & Nychas, G.-J. E. (2012). Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International journal of food microbiology*, 157(2), 130-41.

Doulgeraki, A. I., Paramithiotis, S., Kagkli, D. M., & Nychas, G.-J. E. (2010). Lactic acid bacteria population dynamics during minced beef storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *Food microbiology*, 27(8), 1028-34.

Doulgeraki, A. I., Paramithiotis, S., & Nychas, G.-J. E. (2011). Characterization of the Enterobacteriaceae community that developed during storage of minced beef under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *International journal of food microbiology*, 145(1), 77-83.

DuPont-Danisco. (2016). MicroGARD Fermentates. Recuperado 6 de mayo de 2016, a partir de <http://www.danisco.com/product-range/antimicrobials/microgard/>

Ercolini, D., Russo, F., Torrieri, E., Masi, P., & Villani, F. (2006). Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 4663-4671.

Esmer, O., Irkin, R., Degirmencioglu, N., & Degirmencioglu, A. (2011). The effects of modified atmosphere gas composition on microbiological criteria, color and oxidation values of minced beef meat. *Meat science*, 88, 221-226.

European Commission: Health & Consumer Protection Directorate-General. (1999). *Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on Listeria monocytogenes*. Directorate B - Scientific Health Opinions.

European Food Safety Authority (EFSA). (2005). Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to Clostridium spp in foodstuffs. *The EFSA Journal*, 1, 1-65.

European Food Safety Authority (EFSA). (2007). Introduction of a Qualified Presumption of Safety

(QPS) approach for a assessment of s elected microorganisms referred to EFSA. Opinion of the Scientific Committee. *EFSA Journal*, 587, 1-16.

European Food Safety Authority (EFSA). (2014). EFSA explains zoonotic diseases: Salmonella.

European Food Safety Authority (EFSA). (2015). *Campylobacter and Listeria infections still rising in the EU – say EFSA and ECDC*.

Food and Drug Administration. (2013). Evaluation and Definition of Potentially Hazardous Foods - Chapter 3. Factors that Influence Microbial Growth. Recuperado a partir de <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm094145.htm>

Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., & Ben Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International journal of food microbiology*, 120(1-2), 51-70.

Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., & Valdivia, E. (1989). Bactericidal and bacteriolytic action of peptide antibiotic AS-48 against Gram-positive and Gram-negative bacteria and other organisms. *Research in microbiology*, 140(1), 57-68.

Garcha, S., & Natt, N. K. (2012). In situ control of food spoilage fungus using *Lactobacillus acidophilus* NCDC 291. *Journal of food science and technology*, 49(5), 643-8.

Ghali, H., Benkerroum, N., Doguiet, D. D., Delvigne, F., & Thonart, P. (2007). Comparison of the performances of different fermentation strategies on cell growth and bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 541-549.

Gram, L. (1993). Inhibitory effect against pathogenic and spoilage bacteria of *Pseudomonas* strains isolated from spoiled and fresh fish. Inhibitory Effect against Pathogenic and Spoilage Bacteria of *Pseudomonas* Strains Isolated from Spoiled and Fresh Fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(7), 2197-2203.

Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bartholin, B., Christensen, A., & Givskov, M. (2002). Food spoilage – interactions between food spoilage bacteria. *International journal of food microbiology*, 78,

79-97.

Helander, I. M., Von Wright, A., & Mattila-Sandholm, T. M. (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against gram-negative bacteria. *Trends in Food Science and Technology*, 8(5), 146-150.

Holzappel, W. H., Geisen, R., & Schillinger, U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International journal of food microbiology*, 24(3), 343-62.

Holzappel, W. H., & Wood, B. J. B. (1995). The Genera of Lactic acid Bacteria. En *The Lactic Acid Bacteria* (Vol. 2). Springer Science & Business Media.

Hugas, M. (1998). Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat science*, 49S1(98), S139-50.

Huis in't Veld, J. (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International journal of food microbiology*, 33(1), 1-18.

Hutkins, R. W., & Nannen, N. L. (1993). pH Homeostasis in Lactic Acid Bacteria. *Journal of dairy science*, 76(8), 2354-2365.

Hwang, C.-A., Sheen, S., Juneja, V., Hwang, C.-F., Yin, T.-C., & Chang, N.-Y. (2014). The influence of acid stress on the growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on cooked ham. *Food Control*, 37, 245-250.

Jamuna, M., Babusha, S. T., & Jeevaratnam, K. (2005). Inhibitory efficacy of nisin and bacteriocins from *Lactobacillus* isolates against food spoilage and pathogenic organisms in model and food systems. *Food Microbiology*, 22, 449-454.

Knox, B. L., van Laack, R. L. J. M., & Davidson, P. M. (2008). Relationships between ultimate pH and microbial, chemical, and physical characteristics of vacuum-packaged pork loins. *Journal of food science*, 73(3), M104-10.

Kouakou, P., Ghalfi, H., Dortu, C., Evrard, P., & Thonart, P. (2010). Combined use of bacteriocin-producing strains to control *Listeria monocytogenes* regrowth in raw pork meat. *International*

Journal of Food Science and Technology, 45, 937-943.

- Koutsoumanis, K., Stamatiou, A. P., Drosinos, E. H., & Nychas, G. J. E. (2008). Control of spoilage microorganisms in minced pork by a self-developed modified atmosphere induced by the respiratory activity of meat microflora. *Food Microbiology*, 25(7), 915-921.
- Koutsoumanis, K., Stamatiou, A., Skandamis, P., & Nychas, G.-J. E. (2006). Development of a microbial model for the combined effect of temperature and pH on spoilage of ground meat, and validation of the model under dynamic temperature conditions. *Applied and environmental microbiology*, 72(1), 124-34.
- La Stora, A., Ferrocino, I., Torrieri, E., Di Monaco, R., & Mauriello, G. (2012). A combination of modified atmosphere and antimicrobial packaging to extend the shelf-life of beefsteaks stored at chill temperature. *International journal of food microbiology*, 158, 186-194.
- Labadie, J. (1999). Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. *Meat Science*, 52(3), 299-305.
- Laboratorios Amerex. (2016). Cultivos protectores y conservantes. Recuperado 13 de mayo de 2016, a partir de <http://www.laboratoriosamerex.es/productos.html>
- Lanciotti, R., Patrignani, F., Bagnolini, F., Guerzoni, M. E., & Gardini, F. (2003). Evaluation of diacetyl antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiology*, 20(5), 537-543.
- Langston, S. W., Altman, N. S., & Hotchkiss, J. H. (1993). Within and between sample comparisons of Gompertz parameters for *Salmonella enteritidis* and aerobic plate counts in chicken stored in air and modified atmosphere. *Int J Food Microbiol*, 18(1), 43-52.
- Leal-Sánchez, M., Jiménez-Díaz, R., Maldonado-Barragán, A., Garrido-Fernández, A., & Ruiz-Barba, J. L. (2002). Optimization of bacteriocin production by batch fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4465-4471.
- LeBlanc, J. G., De LeBlanc, A. D. M., De Souza Oliveira, R. P., & Todorov, S. D. (2014). Use of Synbiotics (Probiotics and Prebiotics) to Improve the Safety of Foods. En R. Bhat & V. Gómez-López

- (Eds.), *Practical Food Safety: Contemporary Issues and Future Directions* (Vol. 9781118474, pp. 497-516). John Wiley & Sons.
- Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International journal of food microbiology*, 55(1-3), 181-186.
- Liu, F., Guo, Y., & Li, Y. (2006). Interactions of microorganisms during natural spoilage of pork at 5 °C. *Journal of Food Engineering*, 72, 24-29.
- Lücke, F.-K. (2000). Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat science*, 56(2), 105-115.
- Madigan, M., Martinko, J. M., Stahl, D. A., & Clark, D. P. (2012). *Biology of Microorganisms* (13^o edición). Benjamin Cummings.
- Mani-López, E., García, H. S., & López-Malo, A. (2012). Organic acids as antimicrobials to control Salmonella in meat and poultry products. *Food Research International*, 45(2), 713-721.
- Maragkoudakis, P. a, Mountzouris, K. C., Psyras, D., Cremonese, S., Fischer, J., Cantor, M. D., & Tsakalidou, E. (2009). Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *International journal of food microbiology*, 130(3), 219-226.
- Mastromatteo, M., Lucera, A., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2009). Microbiological characteristics of poultry patties in relation to packaging atmospheres. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(12), 2620-2628.
- Meng, J., LeJeune, J. T., Zhao, T., & Doyle, M. P. (2007). Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. En M. P. Doyle & L. R. Beuchart (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (3rd ed., pp. 249-269). Was: ASM Press.
- Meng, X. C., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Daly, C., & Ross, R. P. (2008). Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry*, 106(4), 1406-1416.
- Midolo, P. D., Lambert, J. R., Hull, R., Luo, F., & Grayson, M. L. (1995). In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *The Journal of applied bacteriology*, 79(4), 475-479.

- Mills, S., Stanton, C., Hill, C., & Ross, R. P. (2011). New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods. *Annual review of food science and technology*, 2, 299-329.
- Morgan, S. M., Galvin, M., Ross, R. P., & Hill, C. (2001). Evaluation of a spray-dried lactidin 3147 powder for the control of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in a range of food systems. *Letters in applied microbiology*, 33(5), 387-91.
- Nychas, G.-J. E., Marshall, D. L., & Sofos, J. N. (2007). Meat, Poultry, and Seafood. En M. P. Doyle & L. R. Beuchat (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (3rd ed., pp. 105-140). Washington: ASM Press.
- Okolocha, E., & Ellerbroek, L. (2005). The influence of acid and alkaline treatments on pathogens and the shelf life of poultry meat. *Food Control*, 16, 217-225.
- Palumbo, S. A., Call, J. E., Schultz, F. J., & Williams, A. C. (1995). Minimum and Maximum Temperatures for Growth and Verotoxin Production by Hemorrhagic Strains of *Escherichia coli*. *Journal Of Food Protection*, (4), 352-454.
- Papadopoulou, O. S., Doulgeraki, A. I., Botta, C., Cocolin, L., & Nychas, G.-J. E. (2012). Genotypic characterization of *Brochothrix thermosphacta* isolated during storage of minced pork under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *Meat science*, 92(4), 735-8.
- Parente, E., & Ricciardi, A. (1999). Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 628-638.
- Pin, C., García de Fernando, G. D., & Ordóñez, J. A. (2002). Effect of modified atmosphere composition on the metabolism of glucose by *Brochothrix thermosphacta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4441-4447.
- Pongtharangkul, T., & Demirci, A. (2006). Effects of fed-batch fermentation and pH profiles on nisin production in suspended-cell and biofilm reactors. *Applied microbiology and biotechnology*, 73, 73-79.
- Reglamento (UE) N° 101/2013 de la comisión de 4 de febrero de 2013 relativo a la utilización de ácido láctico para reducir la contaminación de superficie de las canales de bovinos, Diario

Oficial de la Unión Europea 3 (2013).

Reglamento (UE) N° 1129/2011 de la comisión de 11 de noviembre de 2011 por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) N° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión, Diario Oficial de la Unión Europea 1-177 (2011).

Reis, J. a., Paula, a. T., Casarotti, S. N., & Penna, a. L. B. (2012). Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Engineering Reviews*, 4(2), 124-140.

Remenant, B., Jaffrès, E., Dousset, X., Pilet, M. F., & Zagorec, M. (2015). Bacterial spoilers of food: Behavior, fitness and functional properties. *Food Microbiology*, 45, 45-53.

Russo, F., Ercolini, D., Mauriello, G., & Villani, F. (2006). Behaviour of *Brochothrix thermosphacta* in presence of other meat spoilage microbial groups. *Food microbiology*, 79, 2006.

Saucier, L., Gendron, C., & Gariépy, C. (2000). Shelf life of ground poultry meat stored under modified atmosphere. *Poultry science*, 79, 1851-1856.

Schelin, J., Wallin-Carlquist, N., Cohn, M. T., Lindqvist, R., Barker, G. C., & Rådstrom, P. (2011). The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence*, 2(6), 580-92.

Schiffner, E., Hagedorn, W., & Opperl, K. (1978). *Cultivos bacterianos para las industrias cárnicas*. Zaragoza: Acribia, S. A.

Schillinger, U., Geisen, R., & Holzapfel, W. H. (1996). Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends in Food Science & Technology*, 7(5), 158-164.

Sebranek, J. G. (2004). Semidry Fermented Sausages. En Y. H. Hui, L. Meunier-Goddik, J. Josephsen, W.-K. Nip, P. S. Stanfield, & F. Tolrà (Eds.), *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology* (pp. 385-396).

Settanni, L., & Corsetti, A. (2008). Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International journal of food microbiology*, 121(2), 123-38.

- Shabala, L., Lee, S. H., Cannesson, P., & Ross, T. (2008). Acid and NaCl limits to growth of *Listeria monocytogenes* and influence of sequence of inimical acid and NaCl levels on inactivation kinetics. *Journal of food protection*, 71(6), 1169-1177.
- Signorini, M. L., Ponce-Alquicira, E., & Guerrero-Legarreta, I. (2006). Effect of lactic acid and lactic acid bacteria on growth of spoilage microorganisms in vacuum-packaged beef. *Journal of Muscle Foods*, 17, 277-290.
- Sinell, H.-J. (1994). Microbiología de la carne. En O. Prandl, A. Fischer, T. Schmidhofer, & H.-J. Sinell (Eds.), *Tecnología e higiene de la carne* (pp. 170-196). Zaragoza: Acribia, S. A.
- Skandamis, P. N., & Nychas, G. J. E. (2012). Quorum sensing in the context of food microbiology. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5473-5482.
- Stiles, M. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70(2-4), 331-345.
- Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Pavunc, A. L., Habjanič, K., & Matošić, S. (2010). Antimicrobial activity - The most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 48(3), 296-307. <http://doi.org/429>
- Tagg, J. R., Dajani, A. S., & Wannamaker, L. W. (1976). Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40(3), 722-756.
- Talon, R., & Leroy, S. (2011). Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentations. *Meat science*, 89, 303-309.
- Tamime, A. Y., & Robinson, R. K. (2007). *Tamime and Robinson's Yoghurt Science and Technology* (3rd ed.). Cambridge: Woodhead Publishing.
- Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2005). *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(2-3), 318-326.
- Todorov, S. D., Prévost, H., Lebois, M., Dousset, X., LeBlanc, J. G., & Franco, B. D. G. M. (2011). Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*) — From isolation to application: Characterization of a bacteriocin. *Food Research International*,

44(5), 1351-1363.

Villegas, E., & Gilliland, S. E. (2006). Hydrogen Peroxide Production by *Lactobacillus delbrueckii* Subsp. *Lactis* I at 5°C. *Journal of Food Science*, 63(6), 1070-1074.

Vogel, R. F., Hammes, W. P., Habermeyer, M., Engel, K. H., Knorr, D., & Eisenbrand, G. (2011). Microbial food cultures - opinion of the Senate Commission on Food Safety (SKLM) of the German Research Foundation (DFG). *Molecular Nutrition and Food Research*, 55(4), 654-662.

Wiberg. (2016). - Starter cultures, key helper for professional raw sausage. Recuperado 7 de mayo de 2016, a partir de <http://www.wiberg.eu/en/meat-processing/assortment/fermented-sausage/starter-cultures/>

Wilson, P. D. G., Brocklehurst, T. F., Arino, S., Thuault, D., Jakobsen, M., Lange, M., ... Van Impe, J. F. (2002). Modelling microbial growth in structured foods: Towards a unified approach. *International Journal of Food Microbiology*, 73(2-3), 275-289.

Winkowski, K., Crandall, A. D., & Montville, T. J. (1993). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus bavaricus* MN in beef systems at Refrigeration Temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(8), 2552-2557.

Yang, R., & Ray, B. (1994). Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 11, 281-291.

Zacharof, M. P., & Lovitt, R. W. (2012). Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. A Review Article. *APCBEE Procedia*, 2, 50-56.

Zhang, P., Baranyi, J., & Tamplin, M. (2015). Interstrain Interactions between Bacteria Isolated from Vacuum-Packaged Refrigerated Beef. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(8), 2753-2761.

Zúñiga, M., Pardo, I., & Ferrer, S. (1993). An improved medium for distinguishing between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*, 18(1), 37-42.

CAPÍTULO II

Caracterización y optimización del proceso de obtención de los cultivos starter de *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus pentosaceus*

II. CARACTERIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE LOS CULTIVOS STARTER DE *LACTOBACILLUS PLANTARUM* Y *PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS*

II.1 INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido-lácticas han sido ampliamente utilizadas en los procesos de fermentación de alimentos como cultivos starter, aunque su uso en productos cárnicos es relativamente reciente en comparación con los lácteos y las bebidas alcohólicas (Ricke, Zabala Diaz, & Keeton, 2007). El uso de cultivos starter permite controlar las propiedades organolépticas, la calidad microbiológica y la seguridad del producto (Cocconcelli & Fontana, 2010).

Como cultivos iniciadores en la carne suelen utilizarse micrococáceas catalasa-positivas (*Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus equorum*, entre otros) y bacterias ácido-lácticas (BAL), como *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus pentosaceus*, entre otras comúnmente utilizadas (Cocconcelli & Fontana, 2010; Ricke et al., 2007).

Los cambios que producen las BAL en la carne están asociados principalmente a su capacidad disminuir el pH gracias a la producción de ácidos. Esto trae como consecuencia una disminución de la capacidad de retención de agua de la carne, lo que favorece la deshidratación de los productos crudo-curados. La acidificación del medio propicia la selección de la microbiota presente en la carne hacia aquellos microorganismos capaces de crecer en condiciones de pH bajo. Pero además de los ácidos, las BAL son capaces de producir una variedad de sustancias antimicrobianas, lo cual, aunado al hecho de que se inoculan en altas cantidades en la masa cárnica, conlleva que acaben por convertirse en la flora dominante (Hugas, 1998; Schiffner, Hagedorn, & Oppel, 1978).

Las BAL utilizadas como starter son seguras desde el punto de vista de su consumo en alimentos. Estas bacterias se consumen junto con sus metabolitos en los productos fermentados, de modo que, en general, los compuestos antimicrobianos que producen

son reconocidos como igualmente seguros (Adams & Nicolaidis, 1997; Garver & Muriana, 1993). Por ello, más allá de su uso como starter, es especialmente interesante la aplicación de las BAL y sus metabolitos antimicrobianos en la conservación de alimentos. En la producción de cultivos starter, después del proceso de fermentación, el caldo de fermentación agotado se separa de la biomasa como residuo. Considerando los compuestos antimicrobianos que pueden producir las BAL, es interesante explorar alternativas para el aprovechamiento del caldo de fermentación y/o sus metabolitos como bioconservantes. En este aspecto es importante considerar que para la producción de cultivos starter, los medios de cultivo y las condiciones de la fermentación se seleccionan para favorecer un mayor rendimiento de biomasa, lo cual generalmente está ligado a una mayor producción de metabolitos antimicrobianos como las bacteriocinas (Todorov et al., 2011).

En muchos estudios se ha demostrado la efectividad en la extensión de la vida útil de los alimentos gracias a los compuestos antimicrobianos producidos por distintas cepas de BAL, tanto al aplicarlos directamente en los alimentos (especialmente bacteriocinas) o por medio de la adición de cultivos protectores (Andrés-Bello, De Jesús, García-Segovia, Moreno, & Martínez-Monzó, 2015; Castellano, Belfiore, Fadda, & Vignolo, 2008; Guinane, Cotter, Hill, & Ross, 2005; Khan, Flint, & Yu, 2010; Pucci, Vedamuthu, Kunka, & Vandenberg, 1988). Por otra parte, muchos trabajos de investigación han estado orientados a optimizar las condiciones de fermentación en medio de cultivo para la producción de bacteriocinas (Altuntas, Cosansu, & Ayhan, 2010; Biswas, Ray, Johnson, & Ray, 1991; Enitan, Adeyemo, & Ogunbanwo, 2011; Leal-Sánchez, Jiménez-Díaz, Maldonado-Barragán, Garrido-Fernández, & Ruiz-Barba, 2002; Todorov et al., 2011; Verellen, Bruggeman, Van Reenen, Dicks, & Vandamme, 1998), cuyos resultados ponen en relieve que para determinar el posible uso de una cepa de BAL como bioconservante, se requiere conocer en detalle sus características metabólicas, especialmente en lo que se refiere a sus necesidades nutricionales, pH óptimo de crecimiento y demás factores que regulan su metabolismo, de manera que se puedan seleccionar las condiciones que maximicen la producción de compuestos antimicrobianos.

Tomando en cuenta estas consideraciones, en este capítulo se realiza un estudio preliminar de la factibilidad técnica de elaborar bioconservantes a partir de los caldos de fermentación obtenidos del proceso de producción de cultivos starter de *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus pentosaceus*, ambos producidos por la empresa la empresa colaboradora de este proyecto .

El género *Lactobacillus*, está conformado por microorganismos de forma alargada de 0,5 – 1,2 μm por 1 – 10 μm , con una temperatura óptima de crecimiento entre los 30 y 35°C. Son heterofermentativos facultativos, de manera que, en función de las condiciones en las que se desarrollen los procesos metabólicos de este microorganismo, producirán ácido láctico, ácido acético, etanol y CO_2 (Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, Donèche, & Lonvaud, 2006; Sebranek, 2004). Algunos microorganismos pertenecientes a este género son capaces de producir bacteriocinas, como la plantaricina y la lactocina (Castellano et al., 2008).

Por su parte, el género *Pediococcus*, está compuesto por microorganismos de 1 – 2 μm de diámetro, anaerobios facultativos y homofermentativos, de modo que proporcionan como principal producto metabólico ácido láctico (DLo L) sin CO_2 (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Pueden crecer a pH 5 pero no a pH 9, y muchas de las cepas pertenecientes a este género son productoras de bacteriocinas (pediocinas) (Lahtinen, Ouwehand, Salminen, & Von Wright, 2011).

II.2 OBJETIVOS

- Objetivo general:
 - El objetivo general del presente capítulo fue determinar las condiciones óptimas de producción de biomasa y de compuestos antimicrobianos de los cultivos iniciadores *L. plantarum* y *P. pentosaceus* *in vitro*.

▪ **Objetivos específicos:**

Para conseguir el objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar el proceso de obtención de los cultivos iniciadores de *L. plantarum* y *P. pentosaceus* a 30 y 37°C.
- Evaluar la utilización de diferentes medios de cultivo en la producción de biomasa y compuestos antimicrobianos.
- Analizar la capacidad antimicrobiana sobre *Listeria innocua* de los caldos de fermentación libres de células microbianas.

II.3 MATERIALES Y MÉTODOS

II.3.1 Plan de trabajo

El plan de trabajo seguido en el presente capítulo (Figura II-1) se organizó en tres fases las cuales comentan brevemente a continuación.

Fase 1: Caracterización del proceso de producción de los cultivos iniciadores cárnicos

Se caracterizó el proceso de fermentación de los dos microorganismos en estudio, determinando la curva de crecimiento, el pH y la carga inicial del inóculo. Los datos de los recuentos se ajustaron al modelo de Baranyi & Roberts (1994) para analizar las características de la curva de crecimiento y obtener los parámetros característicos del proceso de desarrollo microbiano.

Fase 2: Evaluación de la utilización de medios de cultivo simplificados

Se evaluó la posible utilización de medios de cultivos cuya composición fuese más simple que la del medio MRS. Con ello se perseguía obtener una reducción en costes de materia prima pero sin comprometer la producción de biomasa o de compuestos antimicrobianos que se obtiene con MRS.

Fase 3: evaluación de la capacidad antimicrobiana

Con la finalidad de evaluar la capacidad antimicrobiana de los productos metabólicos obtenidos de los procesos de fermentación en el medio seleccionado en base a los resultados de la fase 2, se obtuvieron los extractos libres de células de los caldos de fermentación a diferentes tiempos de incubación. Se determinó la capacidad antimicrobiana de estos extractos utilizando como microorganismo diana *Listeria innocua*.

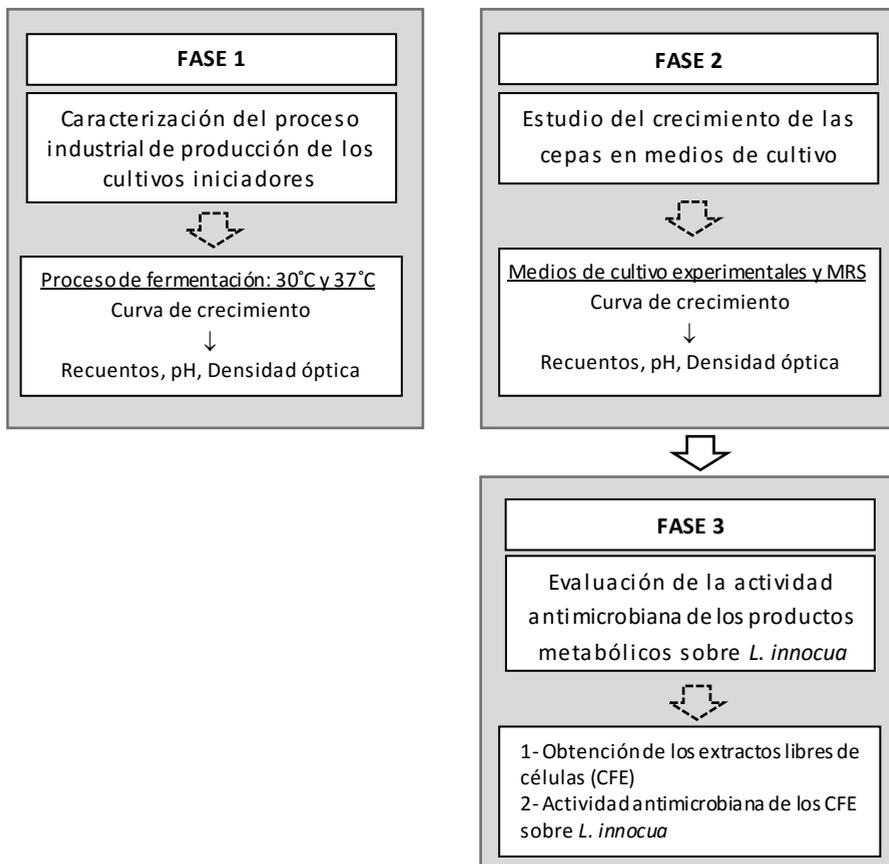


Figura II-1. Plan de trabajo del Capítulo I

II.3.2 Metodología

La metodología seguida para el desarrollo de las fases descritas en el plan de trabajo se detalla a continuación.

II.3.2.1 Caracterización del proceso de producción de los cultivos iniciadores

Los cultivos iniciadores utilizados en el presente trabajo fueron cedidos por la empresa colaboradora de este proyecto

La caracterización del proceso de producción de los de los cultivos starter en estudio (*Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus pentosaceus*) se realizó simulando las condiciones utilizadas en la empresa: temperatura de 30 - 37°C, 24 horas de incubación y caldo De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) como medio de cultivo. Se tomaron muestras a diferentes tiempos durante la fermentación realizándose recuentos microbianos en agar MRS con la finalidad de elaborar la curva de crecimiento de los microorganismos. Los valores de los recuentos se ajustaron al modelo de Baranyi y Roberts (1994) para obtener los parámetros característicos del crecimiento microbiano. Además, se tomaron muestras, a los mismos tiempos que para los recuentos en MRS, para medir el pH y la densidad óptica (600 nm).

II.3.2.1.1 Obtención de la curva de crecimiento

La curva de crecimiento se obtuvo utilizando las mismas condiciones (tiempo y temperatura) y materias primas (medio de cultivo e inóculo) que en el proceso industrial de producción de los cultivos iniciadores proporcionados por la empresa colaboradora. Como inóculo inicial se utilizaron crioperlas impregnadas con las cepas. Para obtención de la curva de crecimiento, se adicionó una crioperla a 100 mL de caldo De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (Scharlau, Barcelona, España), medio de cultivo utilizado en el proceso industrial, y se incubó durante 24 h a 30 o 37°C obteniéndose así la suspensión madre de partida. Posteriormente, se inocularon 800 mL de caldo MRS con 16 mL (2%) de la suspensión madre y se incubaron durante 48 horas a 30 o 37°C, tomándose muestras cada 2 horas (Figura II-2).

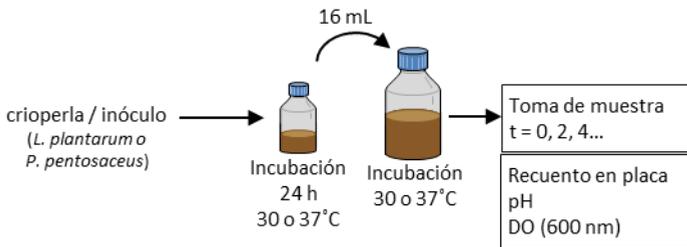


Figura II-2. Obtención de las curvas de crecimiento a 30 y 37°C

La determinación de la carga microbiana (ufc/mL) se realizó mediante siembra en profundidad, en doble capa, en agar MRS (Scharlau, Barcelona, España), e incubando a 30°C por 48 h (ISO 15214:1998).

Adicionalmente, se determinó la carga inicial de las crioperlas, colocando una crioperla en 10 mL de agua de peptona tamponada (Scharlau, Barcelona, España). Se agitó en vortex y se realizaron las diluciones necesarias para recuento en placa, utilizando el método descrito anteriormente.

II.3.2.1.2 Modelización de la curva de crecimiento

Los valores de los recuentos de la curva de crecimiento se ajustaron al modelo de Baranyi y Roberts (1994), indicado en la Ec. II-1:

$$y(t) = y_0 + \mu_{\max} A(t) - \frac{1}{m} \ln \left(1 + \frac{e^{m\mu_{\max}A(t)} - 1}{e^{m(y_{\max} - y_0)}} \right) \quad \text{Ec. II-1}$$

Donde A(t) se define según la Ec. II-2:

$$A(t) = t + \frac{\ln(e^{-\mu_{\max}t} + e^{-h_0} - e^{-vt-h_0})}{\mu_{\max}} \quad \text{Ec. II-2}$$

Por otra parte, y(t) = concentración de células (log ufc/mL) a un tiempo t (h), y₀ = concentración de células (log ufc/mL) para t=0 h, μ_{max} = velocidad máxima específica de

crecimiento ($1/h$), m = parámetro de curvatura para caracterizar el paso desde la fase exponencial, v = parámetro de curvatura que caracteriza la transición hacia la fase exponencial, h_0 = parámetro que cuantifica el estado fisiológico inicial de las células. Para los parámetros de curvatura, se sugiere $v=\mu_{\max}$ y $m=1$, de manera que se reduzca el número de parámetros. Así, el tiempo de latencia λ (h) se puede calcular como $\lambda(h) = h_0/\mu_{\max}$ (Grijpspeerdt & Vanrolleghem, 1999). Además, se obtuvieron los parámetros estadísticos R^2 = coeficiente de correlación y SE = Error estándar del ajuste.

La obtención del modelo y de los parámetros de crecimiento se realizó a través de la herramienta DMFit web-edition de Combase para Excel, disponible en <http://www.combase.cc/>.

II.3.2.1.3 Determinación del pH

Los cambios de pH del caldo en fermentación se midieron tomando muestras a los mismos tiempos que en las determinaciones de la carga microbiana. Las medidas se realizaron por triplicado utilizando un pHmetro CRISON Multimeter MM41 (Barcelona, España).

II.3.2.1.4 Determinación de la Densidad Óptica (OD)

La determinación de la densidad óptica (OD) de los medios en fermentación se realizó empleando un espectrofotómetro Helios Zeta UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, Reino Unido) realizando medidas por triplicado a 600 nm para los mismos tiempos utilizados en la determinación de la curva de crecimiento. Cuando la OD fue mayor que 1,0 se realizaron las diluciones pertinentes en medio de cultivo puro, y posteriormente se aplicó el factor de dilución utilizado para obtener el valor real de la OD.

II.3.2.2 *Estudio de la fermentación en medios de cultivo simplificados*

Se estudiaron diferentes medios de cultivo basados en el MRS pero con una composición simplificada, de manera que se pudiera determinar si las variaciones en los

componentes del medio o en su concentración, mejorarían la capacidad antimicrobiana y producción de biomasa.

La composición de los medios de cultivo experimentales se fundamentó en diferentes estudios, en los que se destacaba la capacidad de determinados componentes de estimular la producción de bacteriocinas. Así, el medio denominado C1, se basó en lo propuesto por Guoqiang, Kaul, & Mattiasson (1992) y Suma, Misra, & Varadaraj (1998) mientras que el medio C2 está basado en los estudios de Altuntas et al. (2010) y Biswas et al. (1991). La composición de dichos medios se muestra en la Tabla II-1. Después de homogeneizar los componentes del medio en agua destilada, se ajustó el pH a 6,0 con NaOH 1N, antes de esterilizarlos en autoclave.

Tabla II-1. Composición de los medios de cultivo (%m/v) MRS, C1 y C2

Componente	Denominación del medio		
	MRS	C1	C2
Glucosa	2	3	1
Extracto de levadura	0,4	1	1
Extracto de carne	0,8	-	-
Triptona	-	-	1
Proteasa peptona	1	-	-
K ₂ HPO ₄	0,2	0,05	-
KH ₂ PO ₄	-	0,05	-
Acetato de sodio	0,5	-	-
Citrato sodio	-	0,1	-
Citrato triamónico	0,2	-	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,02	0,0005	0,0005
MnSO ₄ .7H ₂ O	0,005	0,0003	0,0003
FeSO ₄ .7H ₂ O	-	0,0002	-
Ácido ascórbico	-	0,0005	-
Tween 80 (Polisorbato 80)	0,1	-	0,2

II.3.2.2.1 Preparación y estandarización del inóculo

Para este estudio, se utilizaron inóculos congelados que se prepararon a partir de cultivos starter liofilizados cedidos por la empresa colaboradora. Para ello, el liófilo de *L. plantarum* o *P. pentosaceus* se suspendió en 100 mL de caldo MRS y se incubó a 37°C durante 24 horas. De este cultivo, se extrajeron 16 mL que se inocularon en 800 mL de caldo MRS. Este nuevo cultivo se incubó a 37°C otras 24 horas. La biomasa obtenida se separó del medio por centrifugación (15557g, 10 minutos, 4°C) empleando una centrífuga eppendorf 5804 R (Hamburgo, Alemania). Se eliminó el sobrenadante y el pellet resultante se resuspendió en caldo MRS estéril. A partir de esta suspensión se prepararon inóculos de 1 mL con 20% de glicerol (como crioprotector) que se almacenaron a -80°C hasta su uso.

La utilización de inóculos congelados en vez de crioperlas se debió a motivos prácticos, puesto que se encontró poca reproducibilidad en los recuentos obtenidos a partir de las crioperlas de una de las cepas. Además, los inóculos congelados permitieron estandarizar la concentración inicial de los microorganismos en el medio de fermentación, puesto que a partir de estos inóculos se prepararon otros de concentración estandarizada. Para ello, se determinó la carga microbiana del inóculo concentrado congelado por siembra en MRS e incubando 48 h a 37°C. Conociendo el valor de estos recuentos (ufc/mL), se prepararon diluciones necesarias en agua de peptona tamponada (Scharlau, Barcelona, España) hasta obtener una dilución de 10^3 ufc/mL. A partir de esta dilución se prepararon los nuevos inóculos (10^3 ufc/mL), dispuestos en viales con 20% de glicerol. Dichos viales se almacenaron a -80°C hasta su uso.

II.3.2.2.2 Curva de crecimiento, determinación del pH y DO

Para la obtención de la curva de crecimiento, se agregó un mililitro del inóculo estandarizado de *L. plantarum* o *P. pentosaceus* en 100 mL del medio de cultivo deseado, bien sea C1, C2 o MRS. A partir de este punto, el procedimiento seguido fue el mismo descrito para el caso de las crioperlas, en el apartado II.3.2.1 (Figura II-2). Se modelizaron las curvas de crecimiento y se hallaron los parámetros característicos del crecimiento

microbiano (modelo de Baranyi y Roberts) según se describe en dicho apartado. Así mismo, se determinó la densidad óptica (600 nm) y el pH para los distintos tiempos de toma de muestra.

II.3.2.3 Evolución de la actividad antimicrobiana durante el crecimiento en medio de cultivo

Se determinó la capacidad de las cepas de producir compuestos antimicrobianos durante el crecimiento en MRS, de modo que se pudiera determinar el punto en que la actividad antimicrobiana es máxima. Se utilizó *Listeria innocua* como microorganismo diana. Las pruebas se realizaron por duplicado empleando el caldo de fermentación libre de células microbianas, cuyo método de obtención se describe a continuación.

II.3.2.3.1 Obtención de los extractos libres de células (CFE)

Los extractos libres de células (CFE) se obtuvieron para tiempos de fermentación comprendidos entre las 3 y 48 horas. Para ello, se tomaron alícuotas del medio en fermentación, los cuales se centrifugaron (15557g, 4°C, 10 min) y filtraron empleando membranas de polietersulfona de 0,22 µm (Pall Corp., Michigan, EEUU) para la separación de los microorganismos del medio.

II.3.2.3.2 Actividad antimicrobiana de los CFE

La actividad antimicrobiana se determinó adaptando las técnicas descritas por Parente, Brienza, Moles, & Ricciardi (1995) y Turcotte, Lacroix, Kheadr, Grignon & Fliss, (2004), siguiendo el procedimiento que se esquematiza en la Figura II-3. Para cada tiempo de fermentación, se prepararon diluciones al 50% de los CFE de cada microorganismo en Caldo de Triptona y Soja (TSB) (Scharlau, Barcelona, España). A continuación, las diluciones se inocularon con *Listeria innocua* (CECT 4032) a una concentración estandarizada en $6 \pm 2 \times 10^6$ ufc/mL. Para obtener dicha concentración, se diluyó convenientemente un cultivo de dicho microorganismo de 15 h de crecimiento en TSB a 37°C ($\sim 10^9$ ufc/mL). Todas las diluciones se prepararon en viales, obteniéndose en todos los casos un volumen final de 8 mL (incluyendo el inóculo de *L. innocua*). Los viales inoculados se incubaron a 37°C durante

5 h. El efecto antimicrobiano se determinó midiendo los cambios de la densidad óptica a 600 nm de los viales al inicio y final de la incubación, utilizando el procedimiento descrito en el apartado II.3.2.1.4.

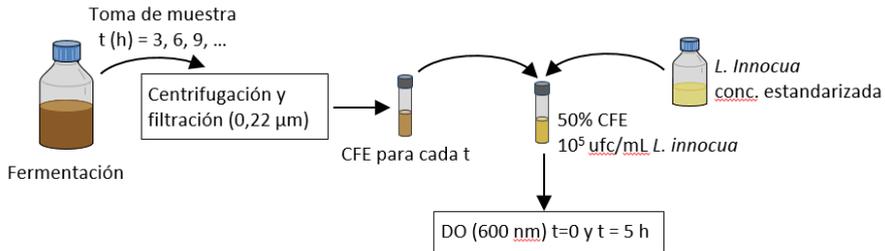


Figura II-3. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos libres de células (CFE)

Por otra parte, se prepararon dos grupos de viales control: los primeros, contenían los CFE al 50% en caldo TSB (sin *L. innocua*) (B1-50), y los segundos correspondían a un control de *L. innocua* (B2), por lo cual contenían TSB inoculado con este microorganismo a la misma concentración de los viales de ensayo. De estos viales control, se realizaron recuentos en agar Brain Heart Infusion (BHIA) (Scharlau, Barcelona, España) tras un periodo de incubación de 37°C durante 24 h. Así, se verificó por una parte que no hubiese crecimiento microbiano en el caso de los viales B1-50, y que la concentración inicial de *L. innocua* en los viales B2 para t = 0 h fuese 10⁶ ufc/mL.

Para cuantificar la magnitud de la inhibición a partir de los valores de absorbancia, se utilizó el Factor de Inhibición (FI) (Cabo, Murado, González, & Pastoriza, 1999), definido como:

$$FI = 1 - \frac{A_m}{A_0} \quad \text{Ec. II-3}$$

Donde: A_m es la absorbancia de la muestra y A_0 es la absorbancia de la muestra control (B2).

II.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II.4.1 Caracterización del proceso de producción de los cultivos iniciadores

El *Lactobacillus plantarum* tiene una temperatura óptima de crecimiento de 30 – 35°C (Sebranek, 2004). Sin embargo, la empresa ATCC (<http://www.atcc.org/>) propone utilizar 37°C para el crecimiento de diferentes cepas de *L. plantarum* (ATCC 1419, ATCC 8014, ATCC 10012, entre otras) en medio de cultivo. Considerando este comportamiento, se necesita realizar ensayos para determinar la temperatura a la cual se obtienen mayores recuentos.

En la Figura II-4 se observan las curvas de crecimiento de *L. plantarum* a 30°C y 37°C, modelizadas a partir del modelo de Baranyi & Roberts (1994), cuyos parámetros se muestran en la Tabla II-2. En toda la curva de crecimiento, los recuentos fueron más altos para la temperatura de incubación de 37°C, alcanzándose una población final (y_f) aproximadamente 1,2 log ufc/mL superior. Asimismo, el tiempo de latencia fue considerablemente menor (2,1 h a 37°C frente a 5,8 h a 30°C). Por otra parte, es importante destacar que la diferencia observada en la población inicial (y_0), se debe a que para la obtención del inóculo de partida, el microorganismo fue incubado a la temperatura de 30°C o 37°C según cada caso, como se indicó en la Figura II-2.

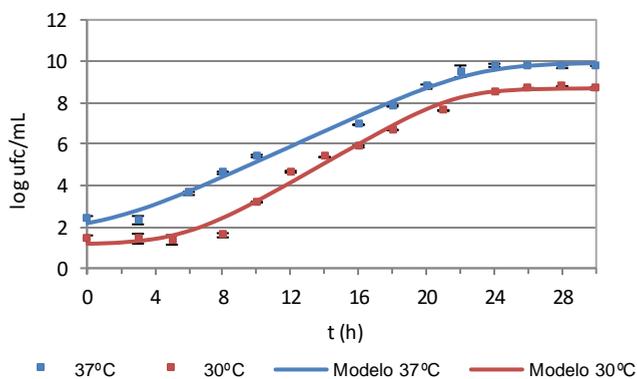


Figura II-4. Curvas de crecimiento de *L. plantarum* a 30 y 37°C

Tabla II-2. Parámetros de crecimiento de *L. plantarum* (\pm error estándar) (modelo de Baranyi & Roberts, 1994) obtenidos a partir de los recuentos a 30 y 37°C

T (°C)	Y_0 (log ufc/mL)	λ (h)	μ_{max} (log ufc·g ⁻¹ ·d ⁻¹)	Y_f (log ufc/mL)	R ²	SE
30	1,18±0,19	5,8±0,8	0,48±0,03	8,69±0,14	0,984	0,366
37	2,17±0,17	2,1±0,7	0,38±0,01	9,93±0,12	0,991	0,258

Y_0 : Número inicial de células (unidades logarítmicas).

λ : Tiempo de latencia.

μ_{max} : Velocidad de crecimiento.

Y_f : Máxima densidad poblacional (unidades logarítmicas).

R²: Coeficiente de determinación del ajuste.

SE: Error estándar del ajuste (desviación estándar estimada de los valores independientes observados, asumidos como constantes).

En base a estos resultados, para la producción de la cepa starter conviene utilizar una temperatura de 37°C, ya que de esta forma se obtiene un mayor número de microorganismos viables (Y_f).

La densidad óptica (OD) y el pH (Figura II-5a) siguieron un comportamiento acorde al observado con el crecimiento microbiano. A mayores recuentos se obtuvo una mayor OD y una disminución más rápida del valor del pH (Figura II-5b), gracias a una mayor producción de ácidos. Así, el descenso de pH comenzó a partir de las 14 h para la fermentación a 37°C y a las 18 h para el caso de la fermentación a 30°C. La velocidad del descenso del pH depende de la capacidad del medio de contrarrestarla, gracias a los componentes que pueden funcionar como buffer (acetato, citrato y fosfato). Al cabo de 32 h los valores de pH fueron del mismo orden independientemente de la temperatura de fermentación utilizada.

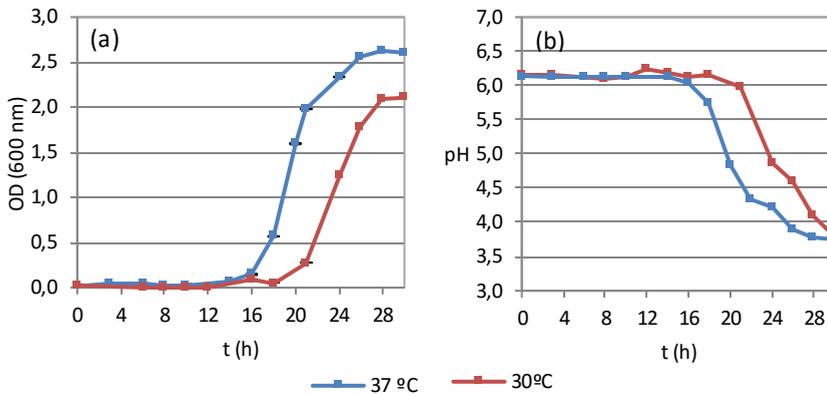


Figura II-5. Variaciones producidas por *L. plantarum* en la densidad óptica (OD, 600 nm) (a) y el pH (b) durante la fermentación en MRS a 30 y 37°C

La producción de ácidos por parte de *L. plantarum* depende del metabolismo utilizado. Dado que es un microorganismo anaerobio facultativo, en ciertas condiciones puede comportarse como homofermentativo (producción de ácido láctico únicamente) o como heterofermentativo, produciendo ácido acético, etanol y CO₂ (De Vos et al., 2009; Zúñiga, Pardo, & Ferrer, 1993).

En el caso del *P. pentosaceus*, se observa en las curvas modelizadas de la Figura II-6, que tanto a 30°C como a 37°C la fase estacionaria se alcanzó rápidamente (en 8-9 h), debido a la elevada concentración inicial del microorganismo a las dos temperaturas estudiadas (véase Tabla II-3). La μ_f fue similar a 30°C y a 37°C, mientras que la velocidad de crecimiento fue el doble a 30°C. Estas diferencias en la velocidad de crecimiento estarían condicionadas por la carga inicial, siendo esta menor para el caso de la fermentación a 30°C (Tabla II-3).

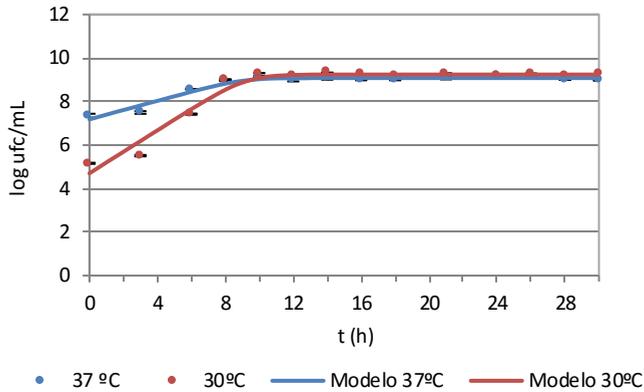


Figura II-6. Curvas de crecimiento de *P. pentosaceus* a 30 y 37°C

Tabla II-3. Parámetros de crecimiento de *P. pentosaceus* (\pm error estándar) (modelo de Baranyi & Roberts, 1994) obtenidos a partir de los recuentos a 30 y 37°C

T (°C)	Y_0 (log ufc/mL)	λ (h)	μ_{max} (log ufc·g ⁻¹ ·d ⁻¹)	Y_f (log ufc/mL)	R ²	SE
30	4,71±0,17	-	0,493±0,034	9,24±0,06	0,961	0,272
37	7,18±0,07	-	0,212±0,018	9,08±0,04	0,951	0,158

Y_0 : Numero inicial de células (unidades logarítmicas).

λ : tiempo de latencia.

μ : velocidad de crecimiento.

Y_f : Máxima densidad poblacional (unidades logarítmicas).

R²: Coeficiente de determinación del ajuste.

SE: Error estándar del ajuste (desviación estándar estimada de los valores independientes observados, asumidos como constantes).

Los resultados indican un crecimiento más rápido a 37°C que a 30°C. En base a lo encontrado en la bibliografía, la temperatura óptima de crecimiento de *P. pentosaceus* sería dependiente de la cepa utilizada. Por ejemplo, se han reportado valores de 28 - 32°C (Raccach, 2014) o 28 - 35°C (Papagianni & Anastasiadou, 2009), mientras que en la colección de cepas de ATCC (<http://www.atcc.org/>) se indica que *P. pentosaceus* ATCC 33316 tiene una temperatura óptima de 35-37°C, la ATCC 43201 de 30°C y ATCC 25745 de 37°C.

La OD aumenta rápidamente a partir de $t=0$ h (Figura II-7a) debido a la alta población inicial, a diferencia del *L. plantarum* (Figura II-5), con el que se obtuvo un largo intervalo de tiempo sin variaciones en la OD debido a la larga fase de latencia. El descenso del pH (Figura II-7b) producido por *P. pentosaceus* se debe a la producción de ácido láctico, único ácido producido en el metabolismo de las hexosas (como la glucosa en el MRS) de las BAL homofermentativas (De Vos et al., 2009; Zúñiga et al., 1993).

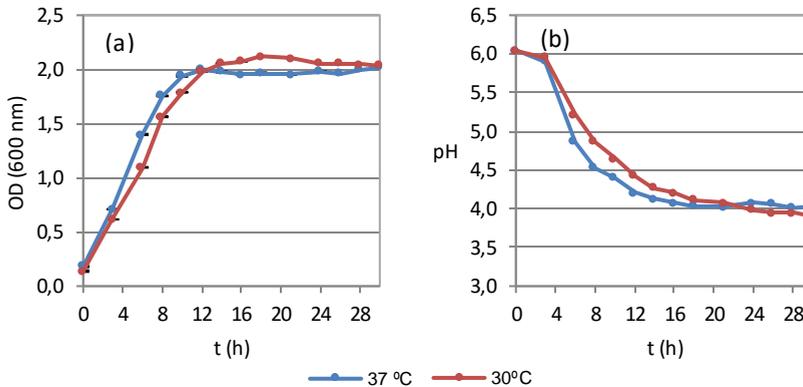


Figura II-7. Variaciones producidas por *P. pentosaceus* en la densidad óptica (OD, 600 nm) (a) y el pH (b) durante la fermentación en MRS a 30 y 37°C

Dadas las discrepancias obtenidas entre la carga inicial de las crioperlas de *L. plantarum* y *P. pentosaceus*, se decidió utilizar inóculos de carga inicial estandarizada que permitieran comparar los parámetros de crecimiento de ambos microorganismos partiendo de la misma carga inicial. Por lo tanto, se prepararon inóculos congelados para la siguiente fase del estudio, con una concentración estandarizada en 10^3 ufc/mL.

II.4.2 Estudio de la fermentación en medios de cultivo alternativos

En la Figura II-8 se muestran las curvas de crecimiento de *L. plantarum* (a) y *P. pentosaceus* (b) en los medios MRS, C1 y C2, cuyas formulaciones se indicaron en la Tabla II-1 (apartado II.3.2.2.).

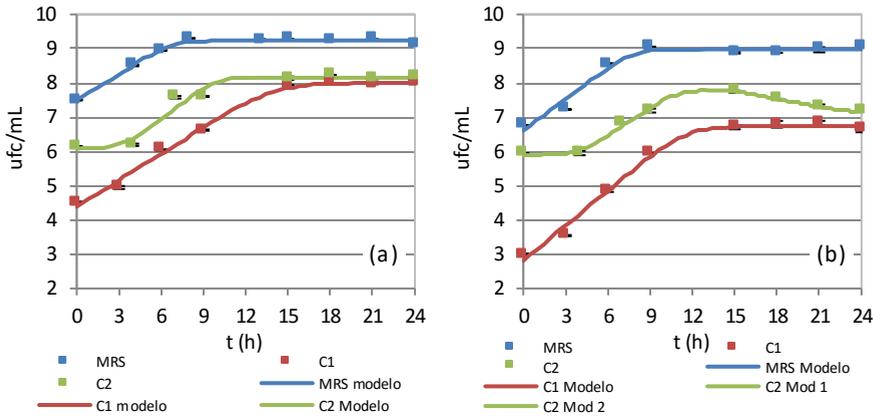


Figura II-8. Curva de crecimiento de *L. plantarum* (a) y *P. pentosaceus* (b) obtenidas a 37°C en MRS, C1 y C2

Para ambos microorganismos, la concentración inicial y_0 , estuvo influenciada por el medio de cultivo utilizado (Tabla II-4). Cabe recordar que el valor de y_0 depende del inóculo empleado, que provenía de un cultivo de 24 h de fermentación, según el procedimiento descrito en el apartado II.3.2.2.2. Los valores más altos de y_0 se obtuvieron con MRS, siendo para *L. plantarum* $7,50 \pm 0,04$ log ufc/mL y para *P. pentosaceus* $2,8 \pm 0,1$ log ufc/mL. Por otro lado, para ambos microorganismos, con el medio C2 se obtuvo una y_0 más alta que con C1.

En cuanto a la máxima densidad poblacional (y_f), nuevamente con el MRS se obtuvieron los valores más altos, siendo $9,24 \pm 0,02$ log ufc/mL para *L. plantarum* y $8,98 \pm 0,05$ log ufc/mL para *P. pentosaceus*. Comparando los medios experimentales C1 y C2, con *L. plantarum* se obtuvieron valores de y_f similares: $8,00 \pm 0,05$ log ufc/mL en C1 y $8,15 \pm 0,07$ log ufc/mL en C2 (ver Tabla II-4). En el caso de *P. pentosaceus*, con C2 se consiguieron recuentos más altos que con C1, con valores de $7,44 \pm 0,07$ log ufc/mL para C2 y $6,74 \pm 0,06$ log ufc/mL para C1.

En relación a la fase de latencia (λ), con el medio C2 se observó una duración de aproximadamente 3 h con *L. plantarum* y 4 h con *P. pentosaceus* (ver Tabla II-4), mientras que con MRS y C1 no se presentó ninguna fase de adaptación.

Tabla II-4. Valores de los parámetros de crecimiento (\pm error estándar) de *L. plantarum* (modelo de Baranyi & Roberts, 1994) obtenidos a partir de los recuentos a 37°C en los medios de cultivo MRS, C1 y C2

Microorganismo Medio	y_0 (log ufc/mL)	λ (h)	μ_{max} (log ufc·g ⁻¹ ·d ⁻¹)	y_f (log ufc/mL)	R ²	SE	
<i>L. plantarum</i>	MRS	7,50 $\pm 0,04$	-	0,254 $\pm 0,010$	9,24 $\pm 0,02$	0,9911	0,054
	C1	4,39 $\pm 0,07$	-	0,257 $\pm 0,011$	8,00 $\pm 0,05$	0,9933	0,115
	C2	6,08 $\pm 0,13$	3,31 $\pm 0,87$	0,317 $\pm 0,052$	8,15 $\pm 0,07$	0,9480	0,192
<i>P. pentosaceus</i>	MRS	6,61± 0,10	-	0,305 $\pm 0,028$	8,98 $\pm 0,05$	0,9663	0,161
	C1	2,81 $\pm 0,10$	-	0,342 $\pm 0,018$	6,7449 $\pm 0,0576$	0,989	0,160
	C2	5,89 $\pm 0,07$	3,98 $\pm 0,59$	0,275 $\pm 0,032$	7,781 $\pm 0,0701$	0,983	0,099
	0-15 h	7,77 $\pm 0,02$	-	-0,078 $\pm 0,006$	7,153 $\pm 0,035$	0,980	0,035
	15-24 h						

y_0 : Numero inicial de células (unidades logarítmicas).

λ : tiempo de latencia.

μ_{max} : velocidad máxima de crecimiento.

y_f : Máxima densidad poblacional (unidades logarítmicas).

R²: Coeficiente de determinación del ajuste.

SE: Error estándar del ajuste (desviación estándar estimada de los valores independientes observados, asumidos como constantes).

Los valores obtenidos de y_0 , y_f y μ_{max} , reflejan que el MRS es el más idóneo de los tres medios de cultivo utilizados (MRS, C1 y C2) para el crecimiento de ambas cepas. En los tres medios de cultivo se utilizó glucosa como fuente principal de energía (Tabla II-1), pero a pesar de que C1 poseía la concentración más alta de este componente, no se produjeron valores más altos de los parámetros de crecimiento con este medio. Se debe considerar que las bacterias ácido-lácticas (BAL) tienen unos requerimientos nutricionales complejos (Aredes Fernández, Saguir, & Manca de Nadra, 2003; De Vos et al., 2009; Hayek & Ibrahim, 2013) y por este motivo, se considera que todos los componentes del medio juegan un papel importante en su crecimiento.

En la Tabla II-1 se observa que los tres medios poseían concentraciones variables de extracto de levadura, extracto de carne, triptona y/o proteasa peptona, lo cual les confiere

una composición de aminoácidos y péptidos con características distintas. Esto influenciaría la producción de células y metabolitos en cada caso. Entre las BAL, los requerimientos de aminoácidos de cada especie pueden ser muy variados. Por ejemplo, dentro del género *Lactobacillus*, existen amplias diferencias en las necesidades nutricionales en función de la especie, e inclusive dependiendo de la cepa de cada especie. Así, la fuente de nitrógeno utilizada afectaría la velocidad de crecimiento (Ummadi & Curic-Bawden, 2010). En el caso de *L. plantarum*, esta especie puede producir las enzimas requeridas para la producción de todos los aminoácidos, excepto leucina, isoleucina y valina (De Vos et al., 2009; Lahtinen et al., 2011), de manera que sus requerimientos de aminoácidos son menores que los de otras especies. Por otra parte, *P. pentosaceus* es la cepa del género *Pediococcus* con el mayor requerimiento de aminoácidos, siendo esenciales para el crecimiento los siguientes: valina, alanina, metionina, prolina, arginina, ácido glutámico, cisteína, tirosina e histidina. Otros aminoácidos tienen un efecto estimulador (Ummadi & Curic-Bawden, 2010).

Se debe tener en cuenta, por otro lado, que concentraciones altas de aquellos péptidos que no son requeridos para el crecimiento, podrían limitar la asimilación de los aminoácidos y péptidos esenciales, afectando negativamente el crecimiento (Lechiancole, Ricciardi, & Parente, 2002), de manera que la composición de las fuentes de nitrógeno debe ser balanceada para el crecimiento óptimo de las BAL. Según Hayek y Ibrahim (2013), en diversos estudios se ha demostrado que reemplazar extracto de levadura, extracto de carne y peptona con otras fuentes de nitrógeno o incluso sustituirlos entre ellos, puede producir un efecto negativo en el crecimiento, considerando que aparte de servir como fuente de aminoácidos, estos componentes aportan carbohidratos, vitaminas y minerales. Por lo tanto, comparando C1 y C2, es posible que con el medio C2 se alcanzaran valores mayores de y_0 , y_f y μ_{max} debido a la particular composición de aminoácidos y péptidos provenientes de la proteasa peptona, que coincidirían en gran medida con los requerimientos nutricionales de las cepas starter estudiadas.

Sin embargo, además de las fuentes de carbono y nitrógeno en el medio, debe tomarse en cuenta que los otros componentes también influyen en el crecimiento de los microorganismos y los metabolitos producidos. Al comparar los valores de y_0 en curvas de crecimiento obtenidas con los medios C1 y C2, se observa que para las dos cepas, este parámetro fue mayor cuando se utilizó C2, lo cual podría deberse en parte a la presencia de Tween 80 en este medio. Este componente (presente además en el MRS) es una fuente soluble de ácido oleico, requerido para el crecimiento de lactobacilos (Sawatari, Hirano, & Yokota, 2006) y pediococos (Raccach, 2014), entre otros motivos debido a que mejora la asimilación de nutrientes en las BAL, así como la producción de bacteriocinas (Hayek & Ibrahim, 2013), aunque este efecto estimulador es dependiente de la concentración utilizada (Hayek & Ibrahim, 2013; Møretrø, Hagen, & Axelsson, 1998).

A pesar de que con C2 se obtuvieron recuentos de y_0 más altos que con C1, esto no fue relevante en el valor de y_f alcanzado. Un factor importante en el cultivo de microorganismos es la capacidad del medio utilizado de permitir que el microorganismo sembrado pueda llegar a una y_f alta y mantenerla. En la Figura II-8a, se observa que para el caso de *L. plantarum*, se alcanzaron valores de y_f similares con C1 y C2, y que se mantuvieron durante varias horas durante la fermentación. En cambio, en el caso de *P. pentosaceus* (Figura II-8b), con el medio C2 se obtuvo una fase de decaimiento a partir de las 15 h. Esto podría deberse al agotamiento de alguno(s) de los nutrientes (por ejemplo la fuente de aminoácidos, comentada anteriormente) o a la ausencia de algún componente. En este sentido, se debe considerar que el medio C2, a diferencia de MRS y C1, carece de citrato, acetato o fosfato, lo cual podría influir negativamente en el metabolismo de las cepas. Sobre estos compuestos, Coelho et al. (2011), sostienen que la adición de fosfato al medio incrementaría la producción de ácido láctico, y que el uso de K_2HPO_4 proporciona K^+ y fosfato, los cuales estimularían el crecimiento microbiano, además de amortiguar el descenso del pH. Iino, Uchimura & Komagata (2002) encontraron que la ruta glicolítica para la producción de ácido láctico por parte de *Lactobacillus plantarum* NRIC 1067^T, podría activarse debido a la presencia de acetato de sodio (presente en el MRS), el cual sirve además de buffer. Sawatari, Hirano, y Yokota (2006)

encontraron resultados similares para el caso de *L. plantarum* NRIC 0380. Según estos autores, los buffers citrato triamónico, acetato de sodio y los fosfatos producirían además un efecto estimulador al inicio de la fermentación. Sin embargo, Møretrø et al. (1998) y Wegkamp, Teusink, De Vos, & Smid (2010), utilizando medios experimentales para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*, observaron que el citrato de amonio no tenía efecto en el crecimiento de este microorganismo. Este compuesto, al igual que el acetato de sodio, se utiliza como inhibidor de otras bacterias y mohos (Lee, Cesario, Owens, Shanbrom, & Thrupp, 2002; Stiles, Penkar, Plocková, Chumchalová, & Bullerman, 2002) Además, según Ummadi & Curic-Bawden (2010), el acetato disminuye la fase de latencia y estimula el crecimiento de *Pediococcus sp.*, de manera que la presencia de tampones en el medio MRS y C1 podrían contribuir a evitar la aparición de una fase de latencia como la observada con C2. Por otra parte, la adición de ácido ascórbico al medio C1 se debe a que este compuesto es esencial para el crecimiento de algunas cepas de BAL (Hayek & Ibrahim, 2013).

En comparación con el MRS, los medios C1 y C2 poseían cantidades significativamente menores de magnesio y manganeso, lo cual podría tener una influencia en los resultados obtenidos (aunque generalmente se requieren concentraciones muy reducidas de estos compuestos). El magnesio, suplementado en los tres medios como $MgSO_4$ posee un efecto estimulador del crecimiento de las BAL, afectando tanto la velocidad de crecimiento como la producción de biomasa (Leroy & De Vuyst, 2001; Loubiere, Cocaign-Bousquet, Matos, Goma, & Lindley, 1997). El manganeso, por su parte, juega también un papel estimulador en el crecimiento de las LAB (Leroy & De Vuyst, 2001), y es esencial para la formación de biomasa de *L. plantarum* cuando se cultiva en presencia de oxígeno (Wegkamp et al., 2010). Este microorganismo es capaz de tolerar el oxígeno, aun cuando carece de superóxido dismutasa y catalasa, ya que el superóxido se remueve a través de una reacción catalizada por el manganeso (Archibald & Fridovich, 1981; Sawatari et al., 2006).

En el caso de *P. pentosaceus* el Mn también interviene como sustituto de la enzima peróxido dismutasa, como secuestrante del O_2^- . El manganeso impulsa además la actividad de muchas reacciones enzimáticas y puede sustituir al magnesio en diferentes reacciones. El género *Pediococcus* requiere además trazas de otros iones inorgánicos para crecer, como potasio, fosfato, calcio, hierro, zinc y magnesio. Este último, es utilizado para la división celular. Estimula el crecimiento y se encuentra involucrado en diferentes procesos metabólicos (Raccach, 2014). En cuanto al hierro, añadido al medio C1 como $FeSO_4$, no es necesario para el crecimiento de *L. plantarum* (Archibald & Fridovich, 1981), pero es utilizado por *Pediococcus sp.* en forma de grupo hemo para la actividad catalasa (Raccach, 2014).

En cuanto a la evolución del pH durante la fermentación (Figura II-9), con ambos microorganismos se observa un descenso más pronunciado con MRS en comparación con C1 y C2. Al inicio de la fermentación, el pH se mantiene alrededor de un valor constante, posiblemente debido a que la baja concentración de ácidos producida hasta el momento podría estar siendo amortiguada con los buffer del medio, especialmente en el caso de C1 y MRS. En el caso de *L. plantarum*, la ausencia de tampones en C2 (fosfatos, acetato o citrato), se evidencia en una caída del pH más temprana en dicho medio (a partir de las 4 h) que en el caso de C1 y MRS (Figura II-9a). Según Coelho et al. (2011), mantener el pH del medio cerca del valor óptimo del crecimiento del microorganismo, ayudaría a alargar la duración de la fermentación. Al final del proceso, se alcanzaron valores de pH menores con MRS ($3,84 \pm 0,04$) que con C1 y C2 ($4,29 \pm 0,04$ y $4,36 \pm 0,01$, respectivamente).

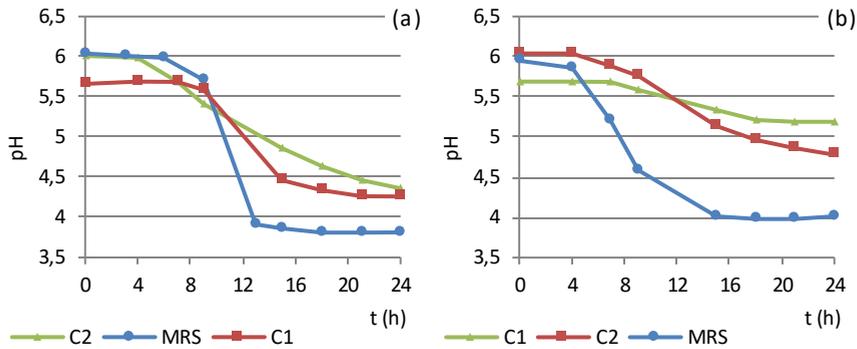


Figura II-9. Variación del pH para *L. plantarum* (a) y *P. pentosaceus* (b) en los tres medios de cultivo utilizados

En el caso del *P. pentosaceus* (Figura II-9b), el descenso en el pH es más gradual, debido posiblemente a que la producción de ácido en este caso es menor en comparación con *L. plantarum*. El pH alcanzado con MRS comienza a diferenciarse notablemente al de los otros medios a partir de las 4 h de fermentación, alcanzándose un pH final constante a partir de las 15 h de 4,00±0,02, a diferencia de lo obtenido con C1 y C2, con los cuales se alcanzaron valores finales de pH más altos, siendo de 5,20±0,01 para C1 y 4,78±0,02 para C2.

El comportamiento del pH se relaciona con los recuentos obtenidos (Figura II-8), de manera que la producción de ácido se encuentra ligada a la generación de células. Del mismo modo, la producción de biomasa, medida como densidad óptica (OD) en la Figura II-10, se relaciona estrechamente con la evolución del pH. El aumento en la OD en todos los casos, es más gradual en el caso de *L. plantarum* en comparación con *P. pentosaceus*, lo cual coincide con la evolución del pH. Debe aclararse que la producción de ácidos se encuentra ligada a la generación de biomasa, aunque no así a la concentración de microorganismos viables (ufc/mL), ya que el descenso del pH continúa después de haberse alcanzado el estado estacionario (Figura II-8), después de las 8 h y 9 h en MRS para *L. plantarum* y *P. pentosaceus*, respectivamente. Para ambos microorganismos la OD final es considerablemente mayor con MRS debido a que, como se comentó anteriormente, con este medio se obtuvieron los recuentos más altos (Figura II-8).

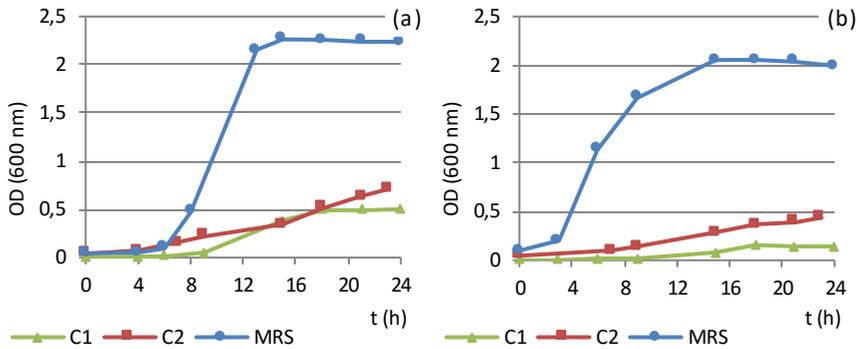


Figura II-10. Variación de la densidad óptica (OD, 600 nm) para *L. plantarum* (a) *P. pentosaceus* (b) en los tres medios de cultivo utilizados

Dados los resultados de las curvas de crecimiento y el comportamiento del pH, conviene utilizar MRS como medio de fermentación para la producción de *L. plantarum* o *P. pentosaceus*, para obtener mayores recuentos, lo que implica mayor rendimiento de la fermentación de cara a la producción de cultivos starter. Por otra parte, con este medio se consigue una mayor producción de ácidos, lo cual es interesante desde el punto de vista de la capacidad antimicrobiana del caldo de fermentación.

En la siguiente fase del plan de trabajo se procedió a cuantificar la actividad antimicrobiana de los extractos libres de células (CFE) obtenidos durante el crecimiento en MRS, para determinar a partir de qué momento de la fermentación se obtiene la máxima actividad antimicrobiana.

II.4.3 Actividad antimicrobiana de los CFE obtenidos durante el crecimiento de *L. plantarum* o *P. pentosaceus* en MRS

Con la finalidad de determinar la actividad antimicrobiana de los caldos de fermentación durante el crecimiento de las cepas de estudio, se obtuvieron extractos libres de células de dichos caldos a diferentes tiempos. La biomasa y el medio se separaron mediante una filtración esterilizante, obteniéndose así el extracto libre de células (CFE) (apartado II.3.2.2). Este proceso permitió estabilizar el caldo de fermentación eliminando

los microorganismos, evitando de este modo que pudieran continuar con el proceso de fermentación.

La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó empleando CFE, y utilizando *L. innocua* como microorganismo diana. El procedimiento seguido se describió en el apartado II.3.2.3.2. De este modo se determinó el factor de inhibición (FI) de los extractos libres de células (CFE) utilizando una concentración de 50%.

En la Figura II-11 se observa que con ambas cepas se produce una inhibición parcial en el crecimiento del microorganismo diana para las muestras obtenidas después de 3 h de fermentación, posiblemente debido a que a este tiempo la concentración de sustancias antimicrobianas fue escasa en comparación con lo obtenido para tiempos posteriores, con los cuales se alcanzó una inhibición total (FI = 1) de *L. innocua*. Esto estaría relacionado con la producción de ácidos, que comenzó a ser notable (descenso continuo del pH), después de las 6 h con *L. plantarum* y las 4 h con *P. pentosaceus*. Por otra parte, al igual que ocurre con los ácidos, la producción y acumulación de bacteriocinas y otros compuestos antimicrobianos depende de la etapa de crecimiento (Todorov et al., 2011). De cualquier modo, se demostró la existencia de actividad antimicrobiana en los CFE de ambos microorganismos, aunque faltarían más estudios para identificar los compuestos antimicrobianos producidos, su concentración y las dosis mínimas efectivas sobre *L. innocua* u otros microorganismos. En todo caso, la actividad antimicrobiana observada podría atribuirse en parte al efecto tóxico del ácido láctico y su capacidad de disminuir el pH del medio.

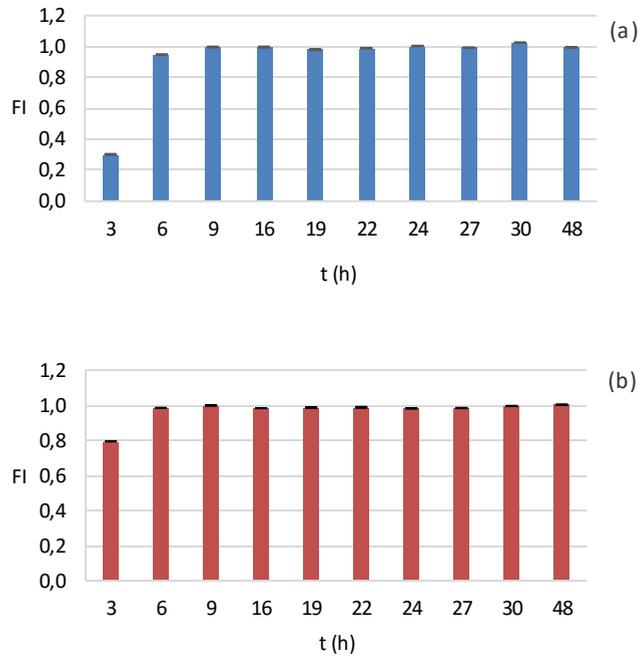


Figura II-11. Factor de Inhibición (FI) sobre *L. innocua* de los extractos libres de células (al 50%) de *L. plantarum* (a) y *P. pentosaceus* (b) obtenidos a diferentes tiempos durante la fermentación en MRS

Los medios alternativos C1 y C2 no fueron testados en cuanto a su capacidad antimicrobiana debido a que ambos presentaron recuentos significativamente inferiores a los obtenidos con MRS (Figura II-8), siendo esto un factor limitante en su utilización para la producción de cultivos iniciadores, por lo cual fueron descartados.

II.5 CONCLUSIONES

Los cultivos iniciadores analizados en este estudio mostraron una mayor actividad cuando fueron incubados a 37°C en comparación con 30°C, dado que se alcanzaron recuentos más altos a dicha temperatura, además de una mayor producción de ácidos (en base al descenso del pH observado en el medio de cultivo). Por ello se recomienda utilizar

dicha temperatura en la producción de los starter, tanto desde el punto de vista de la producción de biomasa como por la producción de ácidos, cuya presencia en el medio de cultivo agotado podría ser interesante dado su poder antimicrobiano.

Al comparar los tres medios de cultivo estudiados, C1, C2 y MRS, se observó que con este último se obtuvieron recuentos más altos y una velocidad de crecimiento mayor, por lo cual es el más idóneo para la producción de los cultivos iniciadores. Además, con MRS se consigue un descenso mayor en el pH, lo cual es interesante para la producción de bioconservantes debido al poder antimicrobiano de los ácidos.

La acumulación de sustancias antimicrobianas como los ácidos orgánicos, hacen posible que se obtenga un efecto antimicrobiano relevante sobre *L. innocua* de los extractos libres de células (50%^{v/v}) de 6 h de fermentación de las dos cepas. Esto indica la posibilidad de explotación de los caldos de fermentación (obtenidos como subproducto en la producción de cultivos iniciadores) de *L. plantarum* y *P. pentosaceus* para la elaboración de bioconservantes. Sin embargo, en futuros estudios, deberá determinarse las concentraciones mínimas efectivas con diferentes microorganismos diana y la identidad de los compuestos antimicrobianos presentes, de modo que pueda explicarse la actividad antimicrobiana observada.

II.6 REFERENCIAS

- Adams, M. R., & Nicolaides, L. (1997). Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. *Food Control*, 8(5-6), 227-239.
- Altuntas, E. G., Cosansu, S., & Ayhan, K. (2010). Some growth parameters and antimicrobial activity of a bacteriocin-producing strain *Pediococcus acidilactici* 13. *International journal of food microbiology*, 141(1-2), 28-31.
- Andrés-Bello, A., De Jesús, C., García-Segovia, P., Pagán-Moreno, M. J., & Martínez-Monzó, J. (2015). Vacuum impregnation as a tool to introduce biopreservatives in gilthead sea bream fillets (*Sparus aurata*). *LWT - Food Science and Technology*, 60, 758-765.
- Archibald, F. S., & Fridovich, I. (1981). Manganese and Defenses against Oxygen Toxicity in *Lactobacillus plantarum*, 145(1).
- Aredez Fernández, P. A., Saguir, F. M., & Manca de Nadra, M. C. (2003). Effect of amino acids and peptides on growth of *pediococcus pentosaceus* from wine. *Latin American Applied Research*, 33, 225-229.
- Baranyi, J., & Roberts, T. (1994). A dynamic approach to predict bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277-294.
- Biswas, S. R., Ray, P., Johnson, M. C., & Ray, B. (1991). Influence of Growth Conditions on the Production of a Bacteriocin, Pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(4), 1265-7.
- Cabo, M., Murado, M., González, M., & Pastoriza, L. (1999). A method for bacteriocin quantification. *Journal of applied microbiology*, 87, 907-914.
- Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S., & Vignolo, G. (2008). A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat science*, 79(3), 483-99.
- Cocconcelli, P. S., & Fontana, C. (2010). Starter Cultures for Meat Fermentation. En F. Toldrà (Ed.), *Handbook of Meat Processing* (pp. 199-218). Wiley-Blackwell.
- Coelho, L. F., De Lima, C. J. B., Rodovalho, C. M., Bernardo, M. P., & Contiero, J. (2011). Lactic acid

- production by new *Lactobacillus plantarum* LMISM6 grown in molasses: Optimization of medium composition. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28(1), 27-36.
- De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., ... Whitman, W. B. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume three The Firmicutes* (Segunda ed). Springer.
- Enitan, A., Adeyemo, J., & Ogunbanwo, S. T. (2011). Influence of growth conditions and nutritional requirements on the production of hydrogen peroxide by lactic acid bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 5(15), 2059-2066.
- Garver, K. I., & Muriana, P. M. (1993). Detection, identification and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from retail food products. *International journal of food microbiology*, 19(4), 241-258.
- Grijnspeerdt, K., & Vanrolleghem, P. (1999). Estimating the parameters of the Baranyi model for bacterial growth. *Food Microbiology*, (16), 593-605.
- Guinane, C. M., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *Journal of applied microbiology*, 98(6), 1316-25.
- Guoqiang, D., Kaul, R., & Mattiasson, B. (1992). Immobilization of *Lactobacillus casei* cells to ceramic material pretreated with polyethylenimine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, (37), 305-310.
- Hayek, S. A., & Ibrahim, S. A. (2013). Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review. *Food and Nutrition Sciences*, 4, 73-87.
- Hugas, M. (1998). Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat science*, 49S1(98), S139-50.
- Iino, T., Uchimura, T., & Komagata, K. (2002). The effect of sodium acetate on the growth yield, the production of L- and D-lactic acid, and the activity of some enzymes of the glycolytic pathway of *Lactobacillus sakei* NRIC 1071(T) and *Lactobacillus plantarum* NRIC 1067(T). *The Journal of general and applied microbiology*, 48(2), 91-102.
- ISO 15214:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria. Colony-count technique at 30 degrees C

- (1998). International Organization for Standardization (ISO).
- Khan, H., Flint, S., & Yu, P.-L. (2010). Enterocins in food preservation. *International journal of food microbiology*, 141(1-2), 1-10.
- Lahtinen, S., Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Von Wright, A. (2011). *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (4^o edición). Fourth Edition CRC Press.
- Leal-Sánchez, M., Jiménez-Díaz, R., Maldonado-Barragán, A., Garrido-Fernández, A., & Ruiz-Barba, J. L. (2002). Optimization of bacteriocin production by batch fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4465-4471.
- Lechiancole, T., Ricciardi, A., & Parente, E. (2002). Optimization of media and fermentation conditions for the growth of *Lactobacillus sakei*. *Annals of Microbiology*, 52, 257-274.
- Lee, Y., Cesario, T., Owens, J., Shanbrom, E., & Thrupp, L. D. (2002). Antibacterial activity of citrate and acetate. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 18(7-8), 665-666.
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2001). Growth of the Bacteriocin-Producing *Lactobacillus sakei* Strain CTC 494 in MRS Broth Is Strongly Reduced Due to Nutrient Exhaustion: a Nutrient Depletion Model for the Growth of Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), 4407-4413.
- Loubiere, P., Coccagn-Bousquet, M., Matos, J., Goma, G., & Lindley, N. D. (1997). Influence of end-products inhibition and nutrient limitations on the growth of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Journal of Applied Microbiology*, 82(1), 95-100.
- Møretrø, T., Hagen, B. F., & Axelsson, L. (1998). A new, completely defined medium for meat lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 85(4), 715-722.
- Papagianni, M., & Anastasiadou, S. (2009). Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. *Microbial Cell Factories*, 8(3), 1475-2859.
- Parente, E., Brienza, C., Moles, M., & Ricciardi, A. (1995). A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity. *Journal of Microbiological Methods*, 22, 95-108.
- Pucci, M., Vedamuthu, E., Kunka, B., & Vandenberg, P. (1988). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(10), 2349-2353.

- Raccach, M. (2014). *Pediococcus*. En C. A. Batt & M.-L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second, Vol. 3, pp. 1-3). Academic Press.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006). *Handbook of enology - The microbiology of wine and vinifications* (2º edición, Vol. 1). John Wiley & Sons.
- Ricke, S. C., Zabala Diaz, I., & Keeton, J. T. (2007). Fermented Meat, Poultry, and Fish Products. En M. Doyle & L. R. Beuchart (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (3º edición, pp. 795-812). Washington: ASM Press.
- Sawatari, Y., Hirano, T., & Yokota, A. (2006). Development of food grade media for the preparation of *Lactobacillus plantarum* starter culture. *The Journal of general and applied microbiology*, 52(6), 349-356.
- Schiffner, E., Hagedorn, W., & Opper, K. (1978). *Cultivos bacterianos para las industrias cárnicas*. Zaragoza: Acribia, S. A.
- Sebranek, J. G. (2004). Semidry Fermented Sa usages. En Y. H. Hui, L. Meunier-Goddik, J. Josephsen, W.-K. Nip, P. S. Stanfield, & F. Toldrà (Eds.), *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology* (pp. 385-396).
- Stiles, J., Penkar, S., Plocková, M., Chumchalová, J., & Bullerman, L. B. (2002). Antifungal activity of sodium acetate and *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of food protection*, 65(7), 1188-1191.
- Suma, K., Misra, M. C., & Varadaraj, M. C. (1998). Plantaricin LP84, a broad spectrum heat-stable bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084 produced in a simple glucose broth medium. *International journal of food microbiology*, 40(1-2), 17-25.
- Todorov, S. D., Prévost, H., Lebois, M., Dousset, X., LeBlanc, J. G., & Franco, B. D. G. M. (2011). Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*) — From isolation to application: Characterization of a bacteriocin. *Food Research International*, 44(5), 1351-1363.
- Turcotte, C., Lacroix, C., Kheadr, E., Grignon, L., & Fliss, I. (2004). A rapid turbidometric microplate bioassay for accurate quantification of lactic acid bacteria bacteriocins. *International journal of Food Microbiology*, 90, 283-293.
- Ummadi, M. (Soni), & Curic-Bawden, M. (2010). Use of Protein Hydrolysates in Industrial Starter Culture. En A. L. Pasupuleti, Vijai K., Demain (Ed.), *Protein Hydrolysates in Biotechnology* (pp.

110-111). Springer Science+Business Media.

- Verellen, T. L. J., Bruggeman, G., Van Reenen, C. A., Dicks, L. M. T., & Vandamme, E. J. (1998). Fermentation optimization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 423. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, *86*(2), 174-179.
- Wegkamp, A., Teusink, B., De Vos, W. M., & Smid, E. J. (2010). Development of a minimal growth medium for *Lactobacillus plantarum*. *Letters in Applied Microbiology*, *50*(1), 57-64.
- Zúñiga, M., Pardo, I., & Ferrer, S. (1993). An improved medium for distinguishing between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*, *18*(1), 37-42.

CAPÍTULO III

Determinación de los principales compuestos antimicrobianos producidos por *L. plantarum* y *P. pentosaceus* y cuantificación de la actividad antimicrobiana

III. DETERMINACIÓN DE LOS PRINCIPALES COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS PRODUCIDOS POR *L. PLANTARUM* Y *P. PENTOSACEUS* Y CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

III.1 INTRODUCCIÓN

Las exigencias de los consumidores y los cambios de tendencias en alimentación impulsan a la industria alimentaria a crear nuevos productos con características mejoradas en cuanto a ingredientes y propiedades nutricionales. Desde hace varios años, existe una tendencia creciente hacia el consumo de alimentos sin aditivos o conservantes químicos, lo cual puede ocasionar una reducción de su vida útil y fecha de caducidad. En este contexto, la bioconservación representa una alternativa a la utilización de conservantes químicos, ya que se basa en la aplicación de los metabolitos antimicrobianos producidos por microorganismos, que se encuentran naturalmente presentes en productos fermentados, tales como chorizos crudo curados, yogures, vegetales encurtidos, entre otros. En estos alimentos, los metabolitos antimicrobianos son consumidos junto con los microorganismos utilizados en el proceso de fermentación, comúnmente bacterias ácido-lácticas (BAL). Aparte de su función tecnológica, estos microorganismos pueden ser útiles como bioconservantes, ya que son capaces de producir una variedad de sustancias antimicrobianas, entre las cuales se encuentran ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, entre otros compuestos (Hartmann, Wilke, & Erdmann, 2011). En general, las BAL son reconocidas como seguras para su uso en alimentos, por lo cual a la mayoría de ellas se les ha concedido el status de GRAS (Generally Recognised as Safe) por la Food and Drug Administration (FDA) de EEUU o de QPS (Qualified Presumption of Safety) por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (Talon & Leroy, 2011).

De los metabolitos antimicrobianos producidos por las BAL, las bacteriocinas son probablemente las que han captado mayor atención, considerando que son numerosos los estudios científicos en los que se propone la utilización de microorganismos productores de bacteriocinas producidas por BAL como bioconservantes (Gálvez, Abriouel,

López, & Ben Omar, 2007; Reis, Paula, Casarotti, & Penna, 2012; Stiles, 1996; Sung et al., 2013). Para la obtención de bacteriocinas y su aplicación en estado puro, los caldos de fermentación que las contienen suelen someterse a un proceso de purificación, que desde un punto de vista industrial puede resultar poco práctico debido a que requiere aplicar procedimientos relativamente complejos con equipos de separación específicos, lo cual puede resultar en un proceso económicamente costoso (Parente & Ricciardi, 1999). Además, generalmente se esperan mayores pérdidas de la capacidad antimicrobiana de las bacteriocinas mientras mayor es el nivel de purificación (Carolissen-Mackay, Arendse, & Hastings, 1997). Por estos motivos es interesante explorar la posibilidad de utilizar los caldos de fermentación con las sustancias bioactivas sin tratamientos de separación o purificación, lo cual, además de simplificar el proceso de producción, contemplaría las ventajas del efecto combinado de los diferentes metabolitos antimicrobianos, pudiendo producirse entre ellos un efecto sinérgico (Hartmann et al., 2011). En ese sentido, la presencia de ácidos orgánicos mejoraría la solubilidad y efectividad de las bacteriocinas, además de que dichos compuestos son también antimicrobianos (Gálvez et al., 2007).

Para aprovechar el conjunto de los compuestos antimicrobianos del caldo de fermentación de las BAL, éste debe someterse a un tratamiento de estabilización, que permita detener el proceso fermentativo, pero que a la vez mantenga inalteradas las propiedades antimicrobianas de las sustancias bioactivas. Conviene además, que los métodos de estabilización presenten ventajas desde un punto de vista técnico y económico (rapidez, simplicidad, bajo coste, etc.).

En este capítulo se abordarán posibles métodos de estabilización de los caldos de fermentación en MRS de los cultivos starter *L. plantarum* y *P. pentosaceus* de la empresa colaboradora de este proyecto, con la finalidad de obtener un producto antimicrobiano que pueda ser aplicado en productos cárnicos. Se estudiará, además, el consumo de azúcar del medio y la producción de ácidos durante el proceso de fermentación. Asimismo, se cuantificará la actividad antimicrobiana de los caldos de fermentación en base a su concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima letal (CML) sobre *L.*

innocua, *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7. Para poder explicar la actividad antimicrobiana de los caldos de fermentación, se determinará la presencia y/o concentración de bacteriocinas y ácidos orgánicos.

III.2 OBJETIVOS

- Objetivo general:

El objetivo general del presente capítulo es obtener un producto antimicrobiano en polvo a partir de los caldos de fermentación de *L. plantarum* y *P. pentosaceus*.

- Objetivos específicos:

Para lograr el objetivo general anteriormente mencionado, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Analizar y seleccionar las tecnologías más eficaces de recuperación y estabilización, de los caldos de fermentación..
- Identificar y cuantificar los principales compuestos antimicrobianos presentes en los caldos de fermentación (ácidos orgánicos, entre otros).
- Cuantificar la actividad antimicrobiana de los caldos de fermentación y productos en polvo en base a la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima letal (CML) empleando diferentes cepas diana: *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7.
- Validar el efecto antimicrobiano de los productos en polvo sobre *Listeria innocua* en carne picada de cerdo.

III.3 MATERIALES Y MÉTODOS

Para el cumplimiento de los objetivos, se estableció el plan de trabajo que se muestra en la Figura III-1 y que se comenta someramente a continuación.

Fase 1: Recuperación y estabilización de los compuestos antimicrobianos

Para la realización de esta etapa, se tomaron muestras en distintas fases de la fermentación (exponencial y estacionaria) en medio de cultivo de los microorganismos starter objeto del estudio. Estas muestras se utilizaron para evaluar diferentes técnicas de recuperación y estabilización de los metabolitos microbianos producidos durante el proceso de fermentación: pasteurización, purificación parcial y filtración. Se realizó una valoración de la actividad antimicrobiana de las muestras sometidas a los distintos tratamientos, utilizando como microorganismo diana *L. innocua*. Además, se analizó la actividad antimicrobiana para diferentes concentraciones de los caldos tratados. Se seleccionó el tratamiento más apropiado para la estabilización de los caldos, el cual será utilizado en las siguientes fases del trabajo.

Fase 2: Identificación y cuantificación de los compuestos antimicrobianos

Se analizó y cuantificó la concentración de ácidos orgánicos, bacteriocinas y peróxido de hidrógeno. Por otro lado, se determinó el consumo de glucosa durante la fermentación.

Fase 3: Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima letal (CML)

El efecto antimicrobiano se cuantificó en base a determinación de la CMI y CML. Como cepas diana se utilizaron los siguientes microorganismos: *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7.

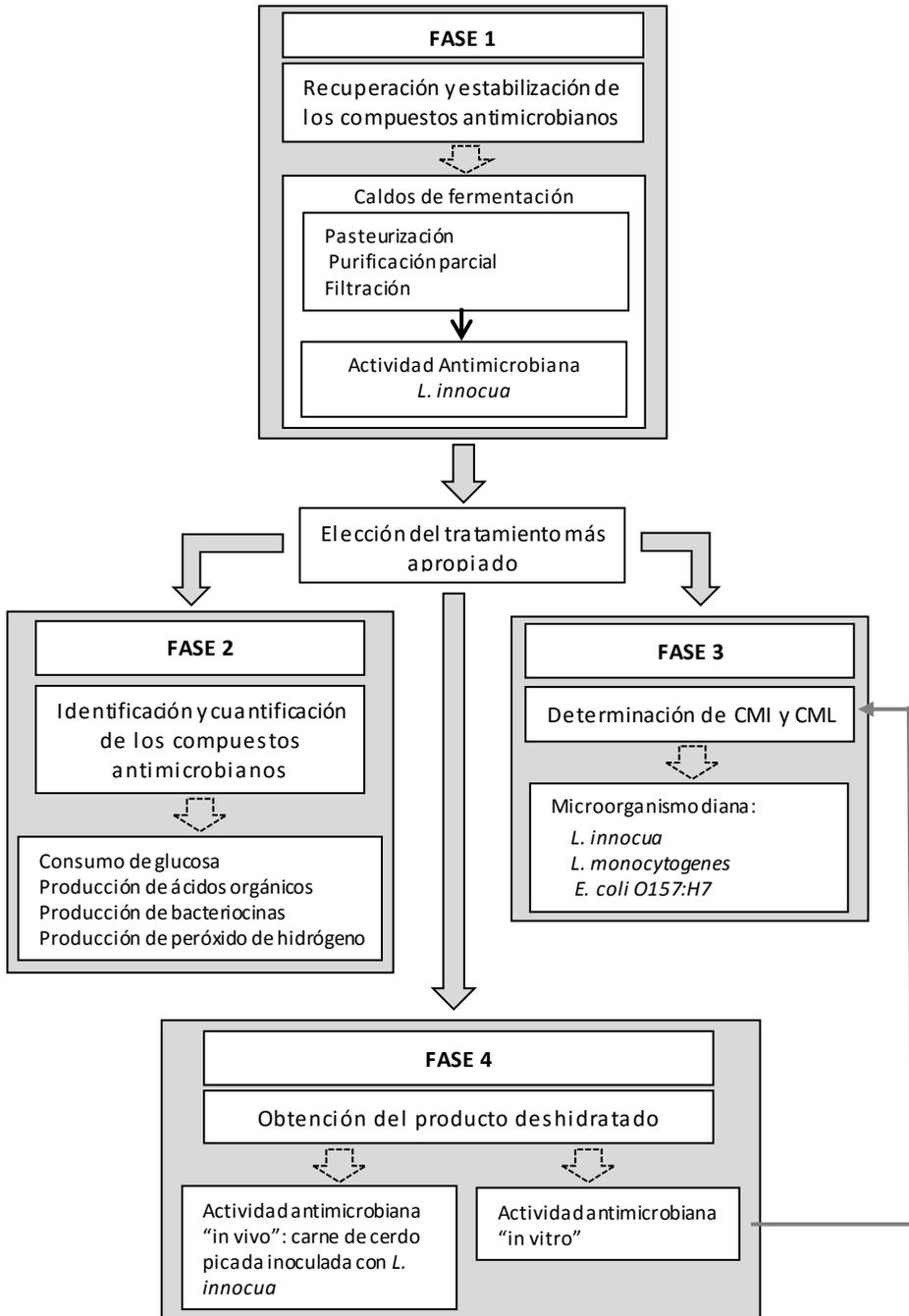


Figura III-1. Plan de trabajo del Capítulo III

Fase 4: Obtención del producto en polvo

En esta última fase, se obtuvo el producto en polvo mediante dos técnicas de secado: atomización y liofilización. Se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* utilizando como microorganismo diana *L. innocua* e *in vivo* sobre muestras de carne picada de cerdo inoculada con este microorganismo (challenge tests).

III.3.1 Recuperación y estabilización de los compuestos antimicrobianos y evaluación de su eficacia

III.3.1.1 Obtención de muestras

Las curvas de crecimiento de las cepas starter en MRS obtenidas en el apartado II.4.2 (Figura II-8), se utilizaron para definir los tiempos de extracción de muestras para evaluar la producción de sustancias antimicrobianas en las diferentes etapas de crecimiento. Dichos tiempos se indican en la Figura III-2. En el caso de *L. plantarum*, las muestras se extrajeron a las 3, 14 y 24 horas mientras que para *P. pentosaceus* los tiempos de extracción fueron 4, 14 y 24 horas. Como se observa en dicha figura, el tiempo más corto pertenece a la fase exponencial y los otros dos tiempos pertenecen a la fase estacionaria.

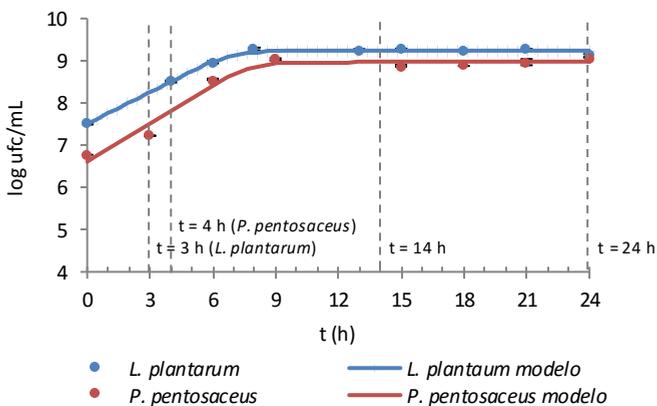


Figura III-2. Curvas de crecimiento en MRS (Capítulo II) y tiempos de extracción de muestra de *L. plantarum* y *P. pentosaceus*

El procedimiento de obtención de los caldos de fermentación, fue el explicado en el apartado II.3.2.2.2. Brevemente, el proceso consiste en preparar un primer cultivo (24 h 37°C) de *L. plantarum* o *P. pentosaceus* en 100 mL de MRS. Este cultivo se utiliza para inocular 800 mL de caldo MRS, del cual se extrajeron muestras a los tiempos de fermentación indicados en la Figura III-2.

III.3.1.2 Efecto de la técnica de recuperación-estabilización sobre la capacidad antimicrobiana de los caldos de fermentación

Se compararon tres técnicas de recuperación y estabilización de los metabolitos producidos por *L. plantarum* y *P. pentosaceus*: Pasteurización (P), Purificación parcial (PP) y Filtración (F):

- Pasteurización (P): Una vez alcanzado un tiempo de fermentación determinado, se extrajo una muestra de 10 mL de caldo, que se sometió a un tratamiento térmico en un baño a 80°C durante 10 minutos. Posteriormente, se enfrió en hielo durante 15 minutos.
- Purificación parcial (PP): El sustrato parcialmente purificado se obtuvo adaptando los procedimientos descritos por Cabo et al. (1999) y Guerra y Pastrana (2001): los extractos de la fermentación se ajustaron a pH a 3,5 mediante la adición de ácido clorhídrico 5 N y se dejaron reposar 10 minutos. El tratamiento con ácido se utiliza para separar las posibles bacteriocinas de las superficies de las células. A continuación, se aplicó un tratamiento térmico a 80°C por 10 minutos en un baño. Al igual que en el tratamiento P, mediante este procedimiento se pretende matar los microorganismos presentes además de inactivar las proteasas, las cuales inhabilitarían las bacteriocinas en caso de que estuvieran presentes (da Silva Sabo, Converti, Todorov, Domínguez, & de Souza Oliveira, 2015; Todorov & Dicks, 2005). Seguidamente, los extractos se centrifugaron a 15557g durante 10 minutos a 4°C en una centrifuga eppendorf 5804 R (Hamburgo, Alemania) y se separó el sobrenadante, el cual se neutralizó con NaOH 10 N hasta pH 6,5.

- Filtración (F): A través de este procedimiento se consigue la separación de los metabolitos de la biomasa, obteniéndose así el extracto libre de células (“cell-free extract”, CFE). Para su obtención, se tomaron muestras de caldo de fermentación a diferentes tiempos y se centrifugaron a 15557g durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se filtraron a vacío, utilizando membranas esterilizantes de polietersulfona de 0,22 µm (Pall Corp., Michigan, EEUU), las cuales se caracterizan por una baja retención proteica, de manera que permitirían el paso de sustancias peptídicas como las bacteriocinas (Ananou, Muñoz, et al., 2010).

Los extractos obtenidos mediante las tres técnicas descritas se almacenaron en congelación a -20°C hasta su uso.

III.3.1.2.1 Estudio preliminar de la actividad antimicrobiana

La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó utilizando la técnica de difusión en agar. Se utilizó el procedimiento descrito por Sharma, Garg, & Singh (2010) con modificaciones (Figura III-3). La actividad antagonista se evaluó utilizando un cultivo de *Listeria innocua* CECT 4032 obtenido tras de 18 – 20 h de fermentación a 37°C (10⁸ ucf/mL) en Caldo de Triptona y Soja (TSB) (Scharlau, Barcelona, España). A partir de este cultivo, se realizaron las diluciones necesarias en TSB hasta obtener una carga de 10⁵ ufc/placa. En placas Petri, se agregó 1 mL de la dilución de *L. innocua* y 15 mL de Agar de Triptona y Soja (TSA) (Scharlau, Barcelona, España) fundido a 45°C. Las placas sembradas, una vez que el agar había solidificado, se dejaron secar entreabiertas y posteriormente se almacenaron durante 30 minutos a 4°C. A continuación, se realizaron 5 pocillos de 9 mm de diámetro en el agar. En cuatro de los pocillos se inocularon 100 µL de los caldos de fermentación a estudiar, mientras que en el quinto pocillo se agregó 100 µL de agua estéril como control. Al cabo de 18 – 24 h se examinaron las placas para detectar la presencia de zonas claras de inhibición de crecimiento microbiano entorno a los pocillos. En los casos afirmativos, se midieron los diámetros de los halos formados, y a partir de estos, se calcularon las áreas de inhibición (mm²) considerando la ecuación del área de un círculo. Las experiencias se realizaron por triplicado.

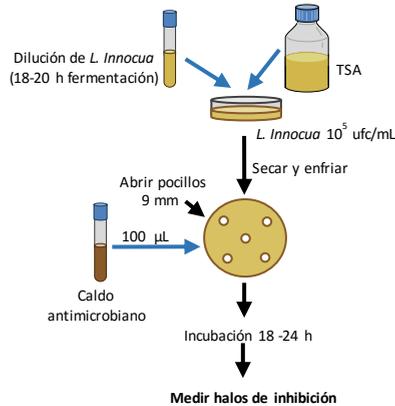


Figura III-3. Determinación de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar

III.3.1.3 Efecto de la técnica de recuperación-estabilización y la concentración del caldo de fermentación sobre la actividad antimicrobiana

Se determinó la actividad antimicrobiana de diferentes concentraciones de los caldos de fermentación tratados según los tres métodos de recuperación-estabilización explicados en el apartado anterior: pasteurización (P), purificación parcial (PP) o filtración (F). Para ello, se utilizó la técnica de dilución en caldo (Nielsen, Dickson, & Crouse, 1990; Zeng et al., 2011), que se resume en la Figura III-4. Se preparó una serie tubos de ensayo con los caldos estabilizados (P, PP o F) a concentraciones de 50, 60 y 70% en TSB. Posteriormente, se adicionó una alícuota de una dilución estandarizada de *Listeria innocua* (CECT 4032), obtenida de un cultivo de 18 – 20 h de fermentación. Este cultivo se diluyó convenientemente de modo que al inocular los tubos de ensayo se alcanzara una concentración final en cada uno de 10^5 ufc/mL. Como control de esterilidad, para cada concentración de caldo estabilizado, se preparó un blanco, que contenía la cantidad correspondiente de dicho caldo más TSB (sin microorganismo diana). Por otro lado, se preparó otro tubo control sin antimicrobiano, pero que contenía *L. innocua* en TSB a una concentración de 10^5 ufc/mL. Los tubos se incubaron durante 18 - 20 horas a una temperatura de 37°C, periodo tras el cual se enumeraron los niveles residuales del microorganismo mediante recuento en placa en agar “Brain Heart Infusion” (BHIA)

(Scharlau, Barcelona, España) con incubación a 37 °C por 24 h. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

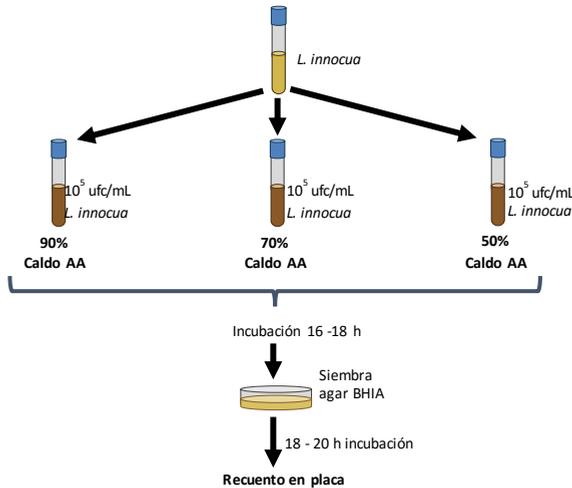


Figura III-4. Determinación preliminar de la actividad antimicrobiana de los caldos de fermentación por el método de dilución en caldo

III.3.2 Identificación y cuantificación de compuestos con actividad antimicrobiana

III.3.2.1 Obtención de los extractos libres de células (CFE) de los cultivos de *L. plantarum* y *P. pentosaceus* en MRS

Se determinaron los compuestos antimicrobianos en los extractos libres de células (CFEs). Para ello, se extrajo un volumen de muestra del caldo de fermentación y se separó la biomasa por centrifugación (15557g, 10 min, 4°C) y una posterior filtración con membranas de 0,22 μ m, tal como se describe en el apartado III.3.1.2.

Los CFEs de *L. plantarum* se obtuvieron durante el proceso de fermentación a las 0, 3, 8, 16, 24, 36 y 48 h, mientras que para *P. pentosaceus* los tiempos utilizados fueron las 0, 4, 8, 16, 24, 36 y 48 h.

III.3.2.2 Curvas de crecimiento

Se realizó la curva de crecimiento utilizando los mismos tiempos comentados anteriormente para la obtención de los CFE. Para ello, se tomaron muestras a dichos tiempos para realizar recuento en placa en agar De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (Scharlau, Barcelona, España), incubando a 30°C, por 48 h (ISO 15214:1998).

Los recuentos obtenidos se utilizaron para obtener curvas modelizadas, según se explica en el apartado II.3.2.1.2.

III.3.2.3 Producción de ácidos y consumo de glucosa durante la fermentación

La concentración de glucosa se determinó por Cromatografía de Intercambio Iónico con detección por pulsos amperométricos (“High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection”, HPAEC-PAD). Este mismo sistema se utilizó para determinar la producción de ácidos, pero utilizando detección de conductividad con supresión química.

Con la finalidad de realizar una comparativa entre métodos cromatográficos, también se analizó la producción de ácidos por medio de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con detector de red de diodos (“High-Performance Liquid Chromatography With Diode Array Detection”, HPLC-DAD).

Para la cuantificación de glucosa, se realizaron diluciones 1:500 de los CFEs, mientras que para el análisis de los ácidos orgánicos, las diluciones fueron 1:25. Las curvas de calibrado se realizaron utilizando patrones de glucosa, cuyo rango lineal fue de 1 a 50 ppm, y de ácidos láctico y acético, con rangos de 50 a 1000 ppm.

III.3.2.3.1 Reactivos y materiales

Los reactivos empleados para las fases móviles fueron: NaOH (Panreac, Barcelona, España), Na₂CO₃ (SIGMA, Madrid, España), NaHCO₃ (SIGMA, Madrid, España), H₃PO₄ (Panreac, Barcelona, España), acetonitrilo (Scharlau, Barcelona, España), CH₃COONH₄

(Scharlau, Barcelona, España). Tanto para la preparación de diluciones y las fases móviles, se empleó agua ultrapura milli-Q (0,05 μ S) obtenida de un equipo de filtración Aquinity Ultra Pure Water System (Scientech Corporation, Taipei, Taiwan).

Los patrones cromatográficos utilizados fueron: D-(+)-Glucosa (SIGMA, Madrid, España), ácido láctico (Dr Ehrenstorfer, Augsburg, Alemania) y ácido acético (Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Alemania).

III.3.2.3.2 Sistema cromatográfico

a. Determinación de glucosa

Se utilizó una columna Metrosep Carb 1 (250 x 4,6 mm) equipada con una pre-columna. La fase móvil utilizada fue NaOH 100 mM. Las condiciones cromatográficas fueron: método isocrático, volumen de inyección de 20 μ L, flujo de 1,0 mL/min, presión (P) de 9 MPa y temperatura de 32°C. Las condiciones del detector fueron: E1+0,05V, E2+0.75V, E3-0.15V; t₁ = 0,40 s, t₂ = 0,20 s, t₃ = 0,40 s.

Se utilizó un equipo de HPAEC de la marca Metrohm Ion Analysis (Herisau, Switzerland) equipado con auto-muestreador, módulo con detector amperométrico con célula de oro para el estudio de glucosa. Los datos se analizaron mediante el software IC Net – Metrohm, versión 2.3.

b. Determinación de los ácidos orgánicos

HPAEC: Se utilizó una columna Shodex IC SI-50 4E (250 x 4,0 mm) equipada con una pre-columna. La fase móvil utilizada fue Na₂CO₃ 3,2 mM (fase A) y NaHCO₃ 1,0 mM (fase B). Las condiciones cromatográficas fueron: método isocrático, volumen de inyección de 20 μ L, flujo de 0,7 mL/min, P = 10 MPa, T = 25°C y conductividad 16 μ S/cm. Se utilizó el mismo equipo de HPAEC que en el análisis de glucosa, con detector amperométrico, módulo de análisis de aniones con supresor químico y detector de conductividad.

En el análisis de ácidos orgánicos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución se empleó un equipo HPLC Waters (Milford, CT, USA) provisto de un detector de red de diodos modelo 2996, módulo de separaciones Alliance 2695 equipado con una bomba cuaternaria, auto-inyector y un desgasificador a vacío. Para el análisis de datos se utilizó el software Empower 2. Se empleó una columna C18 de fase reversa, Luna RP-C18 (250x4,6 mm, 5 μ m) (PHENOMENEX, USA) equipada con una pre-columna. Se utilizó una fase móvil acuosa de 0,5% H₃PO₄ y flujo isocrático de 0,5 mL/min, con volumen de inyección de 10 μ L, temperatura de 30°C y sistema de detección UV con λ = 210 nm.

III.3.2.4 Determinación del pH

El pH de los CFEs se determinó utilizando un pHmetro modelo Consort c-830 (Turnhout, Bélgica), realizando medidas por triplicado de los caldos de fermentación.

III.3.2.5 Determinación de la presencia de bacteriocinas

Se estudió la actividad antimicrobiana de posibles bacteriocinas producidas por los cultivos starter, adaptando los procedimientos descritos por Parente et al. (1995), Cabo et al. (1999) y Turcotte et al. (2004). El método se detallada en el apartado II.3.2.3.2.

La actividad antimicrobiana fue medida en muestras de cultivos de 24 h en MRS de *L. plantarum* o *P. pentosaceus*, obtenidos aplicando el procedimiento descrito en el apartado III.3.1.1. Una vez transcurridas las 24 h, se tomaron muestras de 20 mL que se colocaron en un baño de agua a 80°C, durante 30 min para detener el crecimiento microbiano y la actividad enzimática de las proteasas. Inmediatamente se enfriaron con hielo durante 5 min, se centrifugaron (15557g, 10 min, 4°C) y se les añadió NaOH 10 N hasta ajustar el pH a 6,5. Como cepa diana, se utilizó un cultivo de *Listeria innocua* (CECT 4032) con 15 h de fermentación a 37°C en TSB.

III.3.2.6 Determinación de peróxido de hidrógeno

Para determinar el contenido de peróxido de hidrógeno de los CFEs, se siguió el procedimiento descrito por Villegas y Gilliland (2006), con modificaciones. En primer lugar, se diluyó 1 mL de CFE de *L. plantarum* o *P. pentosaceus* de 24 h de fermentación en 2 mL de tampón fosfato 0,2 M pH 6,5 (Scharlau, Barcelona, España). A continuación, se adicionó 45 μ L de una solución de o-dianisidina 1% (SIGMA, Madrid, España) y 0,45 mL de peroxidasa 0,1% (SIGMA, Madrid, España). Simultáneamente, se preparó un blanco, en el que se sustituyó el CFE por caldo MRS, y un estándar de 0,007% p/v de H₂O₂ (Scharlau, Barcelona, España). Las muestras se incubaron durante 10 minutos a 37°C. La reacción se detuvo mediante la adición de 80 μ L de HCl 4 N a cada muestra. Finalmente, se realizó la lectura de absorbancia a 400 nm y se determinó el contenido de peróxido de hidrógeno comparando con una recta de calibración.

III.3.3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Letal (CML) de los extractos libres de células (CFEs)

Se cuantificó el efecto antimicrobiano de los extractos libres de células (CFEs) en base a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Letal (CML), utilizando el método de dilución en caldo (Nielsen et al., 1990; Zeng et al., 2011) de forma similar a la descrita en el apartado III.3.1.3. La Concentración Mínima Letal (CML) se define como aquella concentración que mata al 99,9% de los microorganismos, es decir, en la que sólo sobrevive el 0,1% de las células viables inoculadas inicialmente. Por tanto, si la concentración inicial es de 10⁵ ufc/mL, se considera que hay efecto letal para aquellos tubos de ensayo de los que se obtengan no más de 100 colonias por mL. Por otra parte, la concentración más baja del extracto que inhibe el crecimiento visible (turbidez) de bacterias se define como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (Barry, 1976).

Para la determinación de la CMI y la CML se prepararon series de tubos de ensayo con los CFEs a concentraciones entre el 10% y el 90% en TSB. Posteriormente, se adicionó una

alícuota de un caldo con el microorganismo diana (18 – 20 h de fermentación), diluido convenientemente de forma tal que se alcanzara una concentración final del mismo de 10^5 ufc/mL en cada tubo. Como cepas diana se utilizaron los siguientes microorganismos: *Listeria innocua* (CECT 4032), *Listeria monocytogenes* (CECT 5725) y *Escherichia coli* O157:H7 (CECT 5947). Los tubos inoculados se incubaron durante 18 - 20 h a una temperatura de 37°C, periodo tras el cual se cuantificaron los niveles residuales del microorganismo mediante recuento en placa. En el caso de *L. innocua* y *L. monocytogenes*, el medio de cultivo empleado fue BHIA (Scharlau, Barcelona, España) con incubación a 37°C por 24 h. Para *Escherichia coli* O157:H7, se usó agar de triptona y soja (TSA) (Scharlau, Barcelona, España), incubando a 37°C por 24 horas. El procedimiento seguido se esquematiza en la Figura III-5.

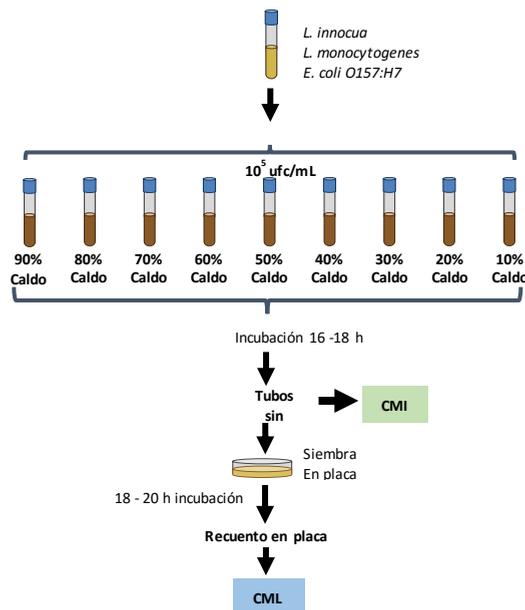


Figura III-5. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima letal (CML) de los caldos de fermentación

Como control de esterilidad, para cada concentración de caldo se preparó un blanco, que contenía la cantidad correspondiente de antimicrobiano en TSB. Por otro lado, se

preparó otro tubo como control de crecimiento del microorganismo diana, el cual TSB (sin antimicrobiano) y $\sim 10^5$ ufc/mL de *L. innocua*.

III.3.4 Obtención de un producto deshidratado a partir de los extractos libres de células (CFE) y determinación de su actividad antimicrobiana

III.3.4.1 Equipos y condiciones de secado

Los CFEs de *L. plantarum* y *P. pentosaceus* de 24 h se sometieron a los procesos de secado por atomización o liofilización. Para el secado por atomización, se empleó un equipo Büchi Mini Spray Dryer B-290 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza), con las condiciones que se indican en la Tabla III-1.

Tabla III-1. Condiciones de atomización de los extractos libres de células (CFEs) de *L. plantarum* y *P. pentosaceus*

Temperatura entrada (°C)	Temperatura salida (°C)	Caudal entrada producto (mL/min)	Caudal entrada aire (L/h)	Caudal de Aspiración (m ³ /h)	Caudal de bomba (%)
157	85	14	414	33	30-40%
196	110	14	414	33	30-40%

El proceso de liofilización se llevó a cabo en un equipo Telstar LyoAlfa-6 (Telstar, Barcelona, España). Las condiciones finales fueron $0,051 \pm 0.013$ mbar de presión y una temperatura de -55 ± 3 °C.

En ambos procesos de secado, se utilizó como soporte dextrina (D) o maltodextrina (M) (Josefa Estellés Mayor S.L., Valencia, España) al 10% p/v.

III.3.4.2 *Determinación de la actividad antimicrobiana “in vitro” de los productos deshidratados*

III.3.4.2.1 Determinación del contenido de sólidos totales

Se determinó el contenido de sólidos totales de la mezcla del extracto libre de células (CFE), de 24 h de fermentación, de ambos microorganismos con los soportes (dextrina (D) o maltodextrina (M)). Para ello, se adicionó un 10% p/v del soporte (cantidad utilizada en los procesos de secado, descritos en la sección III.3.4.1) al caldo de fermentación filtrado (CFE), se homogeneizó y se determinaron los sólidos totales de esta mezcla empleando la técnica descrita en la norma UNE 34824:1983. Esto se hizo para conocer la cantidad de agua a añadir a los productos deshidratados, de modo que se pudieran reconstituir al volumen original y determinar así su actividad antimicrobiana.

III.3.4.2.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Letal (CML)

El producto en polvo reconstituido (caldo de fermentación filtrado (CFE) + Soporte (D o M)) fue utilizado para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y letal (CML) por el método de dilución en caldo, especificado en el apartado III.3.3.

III.3.4.3 *Actividad antimicrobiana in vivo de los productos deshidratados sobre L. innocua (Challenge tests)*

En este apartado se estudió el efecto de los bioconservantes en polvo en carne picada de cerdo inoculada con *L. innocua*. Se utilizó el producto obtenido por liofilización de los caldos de fermentación filtrados (CFE) de 24 h de fermentación de *L. plantarum* (L-24FR) o *P. pentosaceus* (P-24FR); en ambos casos contenían dextrina como soporte.

Para ejecutar el ensayo, la carne de cerdo se picó utilizando una picadora picadora de alimentos Moulinex DP700 (Francia). A continuación, se inoculó con *Listeria innocua* (CECT 4032) proveniente de un cultivo de 24 h de fermentación en caldo de triptona y soja (TSB) (Scharlau, Barcelona, España). Previamente se realizaron las diluciones pertinentes de este cultivo en agua de peptona tamponada de manera que al inocularlo en la carne se

alcanzara una concentración inicial de este microorganismo de 10^2 ufc/g. Esta concentración se corresponde con su límite máximo legal en alimentos listos para consumo (Reglamento (CE) Nº 2073/2005). A continuación, la carne se dividió en porciones de 70 g que se mezclaron con las cantidades requeridas de los productos L-24FR o P-24FR (productos en polvo obtenidos por liofilización de los CFE de *L. plantarum* o *P. pentosaceus* tras 24 horas de fermentación) para obtener concentraciones de 40, 50 o 60 g de antimicrobiano en polvo por kilogramo de carne. Estas concentraciones se eligieron en base a las concentraciones mínimas inhibitorias de L-24FR o P-24FR, obtenidas en el apartado III.3.3. Además, se prepararon muestras control (0 g/Kg) utilizando la misma carne que fue inoculada con *L. innocua*. Las muestras se almacenaron a 4°C durante 7-9 días, y se extrajeron muestras para recuentos de *Listeria spp.* durante este tiempo. Para ello, se extrajeron asépticamente 10 ± 1 g de cada muestra, se homogeneizaron con 90 mL de agua de peptona tamponada (Scharlau, Barcelona, España) en stomacher (IUL Instruments, Barcelona, España). Se prepararon diluciones decimales seriadas para recuento en placa en agar Oxford (Scharlau, Barcelona, España), incubando a 37°C por 24 h (Choi, Kim, Kim, Kim, & Rhee, 2009). Todos los análisis se realizaron por duplicado.

Adicionalmente se midió el pH de las muestras durante el almacenamiento, utilizando un pHmetro microPH 2001 (Crison Instruments, S.A., Barcelona, España) con un electrodo de punción Crison 5231. La medición se realizó en tres puntos de la muestra.

Los resultados de los recuentos se ajustaron al modelo de Baranyi & Roberts (1994) (a través de DMFit), como se describió en el apartado II.3.2.1.2, obteniéndose de esta forma los parámetros del crecimiento microbiano: velocidad máxima (μ_{max}), máxima densidad poblacional (y_{max}), población inicial (y_0), tiempo de latencia (λ). La bondad del ajuste se evaluó por medio del coeficiente de correlación (R^2) y del error estándar del ajuste (SE).

III.3.5 Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos se realizó empleando Statgraphics Centurion XV versión 15.2.06 (Manugistics Corp., Rockville, Md.), 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 la Prueba de Rangos Múltiples utilizando el procedimiento de diferencia mínima significativa de Fisher (LSD) para discriminar entre medias.

III.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.4.1 Recuperación y estabilización de los compuestos antimicrobianos y evaluación de su eficacia

III.4.1.1 Efecto de la técnica de recuperación-estabilización sobre la capacidad antimicrobiana de los caldos de fermentación

Con la finalidad de recuperar y estabilizar los productos metabólicos producidos por *L. plantarum* y *P. pentosaceus* durante el proceso de fermentación, se testaron tres técnicas: pasteurización (P), purificación parcial (PP) y filtración (F). Se evaluó el efecto de estas técnicas en la actividad antimicrobiana (sobre *L. innocua*) de los caldos de fermentación obtenidos tras 3, 14 y 24 horas de fermentación para el caso de *L. plantarum* (L-3 L-14 y L-24) y tras 4, 14 y 24 horas para *P. pentosaceus* (P-4, P-14 y P-24).

En la Tabla III-2 se observa que los extractos de *L. plantarum* (L) y *P. pentosaceus* (P) obtenidos tras 14 y 24 h de fermentación y sometidos a los tratamientos P y F, presentaron actividad antimicrobiana, sin diferencias significativas ($p < 0,05$) entre dichos tratamientos y para ambos tiempos. En el caso de los extractos obtenidos a las 3 h de *L. plantarum* (L-3) y las 4 h de *P. pentosaceus* (P-4), no se obtuvo halos de inhibición, lo cual indica que no había una concentración suficiente de sustancias antimicrobianas con efecto sobre *L. innocua*.

Por otra parte, todos los extractos que fueron sometidos al tratamiento de purificación parcial (PP) no presentaron efecto antimicrobiano, independientemente del tiempo de fermentación.

Tabla III-2. Actividad antimicrobiana de los extractos a diferentes tiempos de fermentación (h) de *L. plantarum* (L) y *P. pentosaceus* (P) en MRS

Extracto	Area de inhibición (mm ² ± SE)*		
	P	PP	F
L-3	0	0	0
L-14	94±2 ^{Aa}	0	99±4 ^{Aa}
L-24	107±5 ^{Aa}	0	114±5 ^{Aa}
P-4	0	0	0
P-14	100±1 ^{Aa}	0	107±20 ^{Aa}
P-24	97±5 ^{Aa}	0	95±7 ^{Aa}

L: *L. plantarum*; P: *P. pentosaceus*; tiempo de fermentación en horas (3, 4, 14 y 24).

*Letra diferente indica diferencias significativas (p<0,05) según el test de Fischer en el ANOVA multifactorial. Mayúscula: factor Tratamiento. Minúscula: factor tiempo de obtención del extracto de L o P.

La necesidad de comparar estas técnicas de estabilización, se debe a que los tratamientos térmicos usualmente utilizados para la inactivación de microorganismos, pueden afectar la actividad antimicrobiana de las sustancias bioactivas. Sobre esto, Ananou et al. (2010) observaron que un tratamiento térmico intenso producía pérdidas de un 80% de la actividad antimicrobiana de la enterocina AS-48, con el agravante de que dicho tratamiento no fue efectivo en la inactivación del microorganismo productor. En general, los tratamientos térmicos moderados suelen ser eficaces en la estabilización de los caldos de fermentación, ya que pueden ser resistidos por las bacteriocinas. Por ejemplo, la plantaricina 423 es estable a tratamientos de 60 min a 80 °C, o 30 minutos a 100 °C, pero pierde 50% de su actividad a 100 °C por 60 min, y el 75% cuando se autoclava (121 °C, 15 min) (Verellen, Bruggeman, Van Reenen, Dicks, & Vandamme, 1998). Por su parte, Jiménez-Díaz et al. (1993), al comparar diferentes tratamientos de estabilización, encontraron que la actividad de la plantaricina S, fue más estable cuando los sobrenadantes de los medios de fermentación se sometieron a una filtración esterilizante en vez de un tratamiento térmico.

La ausencia de actividad antimicrobiana de los extractos P y F al principio de la curva de crecimiento (3 o 4 h) demuestra poca producción o acumulación de sustancias antimicrobianas. Los extractos de las 14 y 24 h mostraron un valor similar, tanto con *L. plantarum* como con *P. pentosaceus* ($p < 0,05$), lo cual indica que a las 14 h ya se ha alcanzado la máxima actividad antimicrobiana.

El tratamiento de purificación parcial (PP) suele utilizarse en la determinación preliminar de sustancias antimicrobianas de caldos de fermentación de BAL (Hartmann et al., 2011; Jiménez-Díaz et al., 1993; Nielsen et al., 1990), generalmente de bacteriocinas. Este tratamiento elimina la acción de los ácidos, de manera que el efecto antimicrobiano obtenido depende de otras sustancias distintas a estos compuestos. Para los dos microorganismos estudiados no se observaron halos de inhibición para los tres tiempos de fermentación. Por tanto, la ausencia de actividad antimicrobiana indicaría que en las condiciones estudiadas, los dos microorganismos no fueron capaces de producir bacteriocinas o no las produjeron en cantidad suficiente para poder ser detectadas a través de la técnica de difusión en agar. Es importante destacar que esta técnica presenta algunos inconvenientes (a pesar de ser ampliamente utilizada en la determinación de la actividad antimicrobiana), ya que es semi-cuantitativa, bastante subjetiva, de baja repetitividad, y depende de la capacidad de la sustancia bioactiva de difundir en el agar (Cabo et al., 1999; Delgado, Brito, Fevereiro, Tenreiro, & Peres, 2005; Turcotte et al., 2004). Por ello, en la siguiente sección se utilizó la técnica de dilución en caldo para ampliar el estudio del efecto antimicrobiano de los extractos, esta vez ensayando diferentes concentraciones de los mismos.

III.4.1.2 Efecto de la técnica de estabilización y la concentración sobre la actividad antimicrobiana

En este apartado se estudió el efecto antimicrobiano de diferentes concentraciones de los caldos de fermentación (50, 70 y 90%) estabilizados según los tratamientos descritos en el apartado anterior (P, PP y F). Se utilizó la técnica de dilución en caldo, la cual permite

una cuantificación real de la actividad antimicrobiana sin depender de la capacidad de difusión del antimicrobiano en el medio de cultivo (Cabo et al., 1999).

En el caso de *L. plantarum*, se observa en Tabla III-3, que el extracto de 3 horas de fermentación (L-3), a una concentración de 90%, presentó un efecto bacteriostático cuando se utilizaron los tratamientos P y F, puesto que se mantuvo la carga microbiana en 10^5 ufc/mL. En el caso de la purificación parcial (PP), no se observó actividad antimicrobiana, ya que en la tercera dilución decimal (10^{-3}) se obtuvo un número de colonias incontable en la placa Petri (al igual que en el caso de los caldos sin diluir, utilizando la técnica de difusión en agar de la Tabla III-2). Esto quiere decir, de forma estimada, que la concentración de colonias en estos casos era igual o superior a 10^5 ufc/mL, lo cual se indica en la Tabla III-3 como “ $\geq 10^5$ ”.

Tabla III-3. Actividad antimicrobiana sobre *L. innocua* de los caldos de fermentación de *L. plantarum* (L) obtenidos a diferentes tiempos 3, 14 y 24 h en función de la concentración (90, 70 y 50%) y el tratamiento de estabilización

%Extracto	Tratamiento	L-3		L-14		L-24	
		Recuento <i>L. innocua</i> (log ufc/mL)		Recuento <i>L. innocua</i> (log ufc/mL)		Recuento <i>L. innocua</i> (log ufc/mL)	
		Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial
90	P	5,56±0,05	5,79±0,01	0	5,79±0,01	0	5,79±0,01
	PP	$\geq 10^5$	5,79±0,01	4,88±0,03	5,69±0,03	$\geq 10^5$	5,73±0,06
	F	5,59±0,02	5,85±0,01	1,46±0,16	5,69±0,03	0	5,73±0,06
70	P	$\geq 10^5$	5,79±0,01	0	5,79±0,01	0	5,79±0,01
	PP	$\geq 10^5$	5,79±0,01	$\geq 10^5$	5,69±0,03	$\geq 10^5$	5,73±0,06
	F	$\geq 10^5$	5,85±0,01	0	5,69±0,03	0	5,73±0,06
50	P	$\geq 10^5$	5,79±0,01	0	5,79±0,01	0	5,79±0,01
	PP	$\geq 10^5$	5,79±0,01	$\geq 10^5$	5,69±0,03	$\geq 10^5$	5,73±0,06
	F	$\geq 10^5$	5,85±0,01	2,02±0,14	5,69±0,03	0	5,73±0,06

P: pasteurización, PP: purificación parcial; F: filtración.

Al disminuir la concentración de caldo L-3 del 90%, al 50% o al 70%, no se observó efecto antimicrobiano. Estos resultados señalan que a estas concentraciones, el extracto L-3 no posee una concentración de metabolitos antimicrobianos que puedan inhibir o

matar a *L. innocua*. Por otra parte, queda demostrada las ventajas de la técnica de dilución en caldo con respecto a la técnica de difusión en agar: La posibilidad de cuantificar la carga residual del microorganismo diana permitió determinar que existe un efecto bacteriostático con L-3 cuando se utiliza al 90%, lo cual no pudo detectarse con la técnica de difusión en agar (Tabla III-2).

En el caso de los extractos obtenidos a las 14 horas de fermentación (L-14), se obtuvo un efecto letal para el caso de los tratamientos P y F al 90%, y un efecto inhibitorio en el tratamiento PP (L-14PP) a la misma concentración. Recuérdese que se considera que existe un efecto letal cuando la concentración de microorganismos es $<10^2$ ufc/mL, mientras que el efecto inhibitorio se produce cuando no hay crecimiento del microorganismo, como se explicó en el apartado III.3.3. En el caso del tratamiento PP (90%), dado que los ácidos se encontraban neutralizados, este efecto antimicrobiano se atribuye a sustancias bioactivas distintas a los ácidos. Sin embargo, la producción de estas sustancias sería escasa, debido a que el efecto inhibitorio desaparece al utilizar concentraciones de 70% o 50% de L-14PP.

El extracto de 24 horas de fermentación (L-24), fue el de mayor poder antimicrobiano, lográndose un efecto letal con las tres concentraciones de caldo utilizadas cuando los tratamientos de estabilización utilizados fueron P y F. Los caldos estabilizados con estos dos tratamientos a este tiempo, presentaron el mismo efecto antimicrobiano a todas las concentraciones ensayadas, a diferencia del tratamiento PP, que inactivó los compuestos antimicrobianos de los extractos. Esto podría atribuirse a la neutralización de los ácidos orgánicos, como se comentó en el apartado anterior. Resalta que la actividad antimicrobiana conseguida con el producto L-14PP no se consiga a las 24 horas de fermentación (L-24PP) (por acumulación de sustancias con efecto antimicrobiano). Partiendo de que esta actividad antimicrobiana a las 14 h podría deberse a la presencia de bacteriocinas, estas podrían haber sido destruidas por enzimas proteolíticas extracelulares, perdiendo su actividad antimicrobiana debido a la agregación entre ellas (Ghalfi, Benkerroum, Doguiet, Delvigne, & Thonart, 2007; Todorov et al., 2011). Esto

quiere decir que el efecto antimicrobiano de las bacteriocinas puede cambiar en función de la etapa de crecimiento del microorganismo, tal como observaron Jiménez-Díaz et al. (1993), quienes determinaron que el efecto antimicrobiano de las plantarinas S y T (obtenidas a partir de un cultivo en MRS de *L. plantarum* LPCO10) era dependiente del tiempo de toma de muestra, entre otros factores.

La actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos durante la fermentación del *P. pentosaceus* (Tabla III-4) muestran un comportamiento similar al del *L. plantarum* (Tabla III-3). Se observa un efecto inhibitorio con el caldo de 4 h de fermentación únicamente cuando se utilizó una concentración de 90% de caldo. A las 14 h se observó un efecto letal para las tres concentraciones de caldo, tanto para el tratamiento de pasteurización (P) como de filtración (F). Los caldos de fermentación sometidos al tratamiento PP no produjeron un efecto antimicrobiano en todos los casos ensayados, por lo cual, en estos casos se descartó la presencia de otros compuestos antimicrobianos diferentes a los ácidos orgánicos o que se produjesen en cantidad suficiente para inhibir *L. innocua* a las concentraciones ensayadas.

Tabla III-4. Actividad antimicrobiana sobre *L. innocua* de los caldos de fermentación *P. pentosaceus* (P) obtenidos a diferentes tiempos (4, 14 y 24 h) en función de la concentración (90, 70 y 50%) y el tratamiento de estabilización.

%Extracto	Tratamiento	P-4		P-14		P-24	
		Recuento <i>L. innocua</i> (log ufc/mL)		Recuento <i>L. innocua</i> (log ufc/mL)		Recuento <i>L. innocua</i> (log ufc/mL)	
		Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial
90	P	5,70±0,09	5,82±0,01	0	5,73±0,06	0	5,82±0,01
	PP	≥10 ⁵	5,82±0,01	≥10 ⁵	5,73±0,06	≥10 ⁵	5,82±0,01
	F	5,69±0,02	5,78±0,02	1,18±0,14	5,69±0,03	0	5,78±0,02
70	P	≥10 ⁵	5,82±0,01	2,19±0,14	5,73±0,06	0	5,82±0,01
	PP	≥10 ⁵	5,82±0,01	≥10 ⁵	5,73±0,06	≥10 ⁵	5,82±0,01
	F	≥10 ⁵	5,78±0,02	1,49±0,18	5,69±0,03	0	5,78±0,02
50	P	≥10 ⁵	5,82±0,01	2,31±0,01	5,73±0,06	0	5,82±0,01
	PP	≥10 ⁵	5,82±0,01	≥10 ⁵	5,73±0,06	≥10 ⁵	5,82±0,01
	F	≥10 ⁵	5,78±0,02	3,09±0,06	5,69±0,03	0	5,78±0,02

P: pasteurización, PP: purificación parcial; F: filtración.

Como se ha comentado anteriormente, la actividad antimicrobiana observada parece depender directamente de los ácidos producidos, por ello es relevante determinar el momento en el que se produce la mayor cantidad posible de ácido. Adicionalmente, es interesante identificar los ácidos presentes, ya que cada uno de ellos puede producir un efecto antimicrobiano diferente (Crowley, Mahony, & van Sinderen, 2013).

III.4.2 Identificación y cuantificación de compuestos con actividad antimicrobiana

III.4.2.1 Producción de ácidos y consumo de glucosa durante la fermentación

Se utilizaron dos técnicas analíticas para cuantificar la producción de ácidos orgánicos y el consumo de glucosa durante el proceso de fermentación de las dos cepas en estudio: la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con detector de red de diodos (“High-Performance Liquid Chromatography With Diode Array Detection”, HPLC-DAD) y la Cromatografía de Intercambio Iónico con detección por pulsos amperométricos (“High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection”, HPAEC-PAD).

III.4.2.1.1 Producción de ácidos medida por HPAEC

Considerando que los dos ácidos orgánicos predominantes en el metabolismo de la BAL son el ácido láctico y el acético (Burgess, Rivas, Mcdonnell, & Duffy, 2008) se compararon los tiempos de elución de los patrones de estos ácidos con los tiempos de elución de los picos correspondientes a las muestras de los caldos de fermentación de *L. plantarum* y *P. pentosaceus*.

En los cromatogramas de la Figura III-6, se observa la presencia de dos picos muy cercanos en los extractos obtenidos a las 0 h, cuyos tiempos de elución se corresponden los de los patrones de los ácidos láctico y acético. En el transcurso de la fermentación, se observó un aumento progresivo del pico de ácido láctico (resultados no mostrados),

mientras que el de ácido acético permaneció invariable. A las 48 h se obtuvo un solo pico, identificado como ácido láctico, desapareciendo el pico correspondiente al ácido acético. Esto se debe a que a medida que aumentó la concentración de ácido láctico desde $t=0$ h hasta $t=48$ h, se produjo coelución de los ácidos láctico y acético y por lo tanto un solapamiento de los picos. Como consecuencia la cuantificación del ácido láctico se obtiene erróneamente con el área resultante de los ácidos láctico y acético, por lo que este método cromatográfico no permitió cuantificar correctamente la concentración de ácido. Para evitar este solapamiento se necesitaría en futuros estudios modificar el método cromatográfico, por ejemplo utilizando un gradiente de concentraciones en la fase móvil. Sin embargo, estos resultados son válidos para indicar la magnitud de ácido producida y muestran el carácter homofermentativo del metabolismo de ambos microorganismos, ya que la concentración de ácido láctico aumentó mientras que la de ácido acético permaneció constante. La presencia de este último se debe a que proviene del medio de cultivo, ya que el acetato de sodio del MRS (véase Tabla II-1) en medio acuoso produciría ácido acético en equilibrio con el acetato. La presencia de ácido acético en el MRS se confirmó analizando el cromatograma del medio de cultivo estéril (resultados no mostrados), en el que se obtuvo un único pico correspondiente al tiempo de elución del patrón de ácido acético.

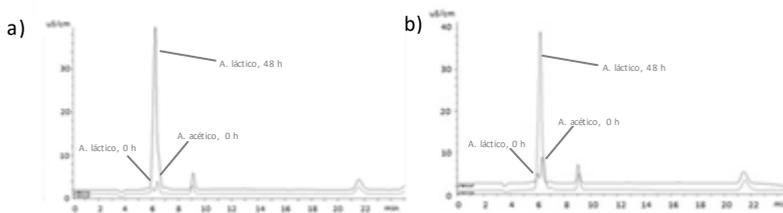


Figura III-6. Cromatogramas de ácidos orgánicos obtenidos por HPAEC: concentraciones de los ácidos láctico y acético en los caldos de fermentación de *L. plantarum* (a) y de *P. pentosaceus* (b) para $t = 0$ h y $t = 48$ h

La producción de ácidos orgánicos depende de la cepa de BAL, la velocidad de crecimiento y la ruta metabólica de fermentación (W. Lin et al., 2009). Los cultivos starter de BAL empleados en la industria cárnica, son normalmente homofermentativos, debido

a que el ácido acético, provocaría sabores desagradables en el producto (Hartmann et al., 2011; Mani-López, García, & López-Malo, 2012). El *L. plantarum*, dentro del género *Lactobacillus*, se encuentra dentro del grupo de los heterofermentativos facultativos. Las bacterias con este tipo de metabolismo producen exclusivamente ácido láctico a partir de hexosas, aunque algunas especies pueden producir además, ácido acético, etanol y ácido fórmico. De igual modo, también son capaces de fermentar pentosas, produciendo los ácidos láctico y acético (Molin, 2010; Todorov, Dimitrov, Dora, & De Melo, 2010). Dado que en el medio MRS el azúcar presente es la glucosa (una hexosa), prevalece el metabolismo homofermentativo, por lo que sólo se obtiene ácido láctico. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que el *L. plantarum* es capaz de pasar de un metabolismo homofermentativo a heterofermentativo, en función de las condiciones del medio, principalmente cuando existe presencia de oxígeno en el medio (Giraud, Lelong, & Raimbault, 1991). Por su parte, los microorganismos pertenecientes al género *Pediococcus* tiene un metabolismo exclusivamente homofermentativo (De Vos et al., 2009), por lo que el único ácido que producen es el ácido láctico.

III.4.2.1.2 Producción de ácidos medida por HPLC-DAD

Los tiempos de elución de los patrones y de las muestras obtenidos por HPLC-DAD se muestran en la Figura III-7. Se observa un aumento del tamaño de los picos correspondientes al ácido láctico a medida que aumentaron los tiempos de extracción de muestra, indicando una acumulación progresiva de este compuesto conforme aumenta la duración del proceso de fermentación. Aproximadamente a los 11,5 minutos se aprecia el pico correspondiente al ácido acético. El tamaño de dicho pico se mantuvo constante en el transcurso de la fermentación, lo cual confirma lo observado en HPAEC: la presencia de ácido acético no se debe a la actividad metabólica, sino a la presencia de acetato de sodio en la composición original del medio MRS, indicada en la Tabla II-1. Se confirmó la presencia de ácido acético en dicho medio en los cromatogramas del medio de cultivo sin inocular (resultados no mostrados), en los que se observó el pico correspondiente al tiempo de elución del ácido acético.

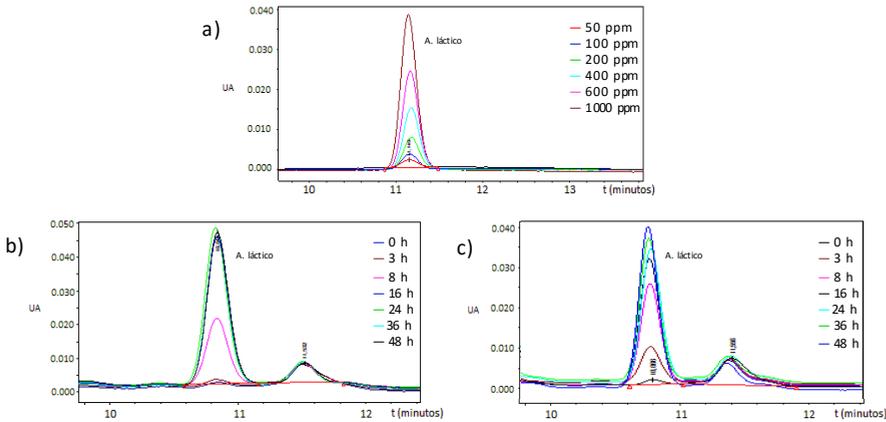


Figura III-7. Cromatogramas de ácidos orgánicos obtenidos por RP-HPLC-DAD: patrón de ácido láctico (a), producción de ácido láctico por *L. plantarum* (b) y *P. pentosaceus* (c) durante el proceso fermentativo

A diferencia de lo obtenido con HPAEC (III.4.2.1.1), la técnica HPLC-DAD permitió cuantificar correctamente la producción de ácido, sin fenómenos de coelución o solapamiento de los picos, como se observa en la Figura III-7.

En base a los cromatogramas de la figura anterior, se intuye que en el caso de *L. plantarum* la tasa de producción de ácido láctico fue muy alta, dado al brusco aumento de los picos de este compuesto en el transcurso del tiempo. Así, a partir de las 16 h la concentración de ácido alcanzó su valor máximo, y se observa un sólo pico con un área intermedia entre los valores máximos y mínimos correspondiente a las 8 h. En el caso de *P. pentosaceus* se observó una producción gradual de ácido, con la aparición de varios picos correspondientes a los diferentes tiempos de toma de muestra.

La producción de ácido láctico por parte de las dos cepas presentó una relación inversa con el consumo de glucosa, según se observa en la Figura III-8. En el caso de *L. plantarum* (Figura III-8a), la glucosa se consumió casi completamente después de las 24 h, alcanzando valores mínimos (0,3 g/L) a las 48 h. La producción de ácido láctico por parte de los lactobacilos heterofermentativos, depende directamente de la concentración de glucosa del medio, la cual consumen prácticamente en su totalidad (Corsetti & Valmorri, 2011). La

curva de ácido láctico de *L. plantarum* muestra un rápido aumento en la concentración de este componente durante la fase exponencial de crecimiento microbiano, la cual se observa en la Figura III-9. El aumento de la concentración continúa después de alcanzar la fase estacionaria, y se mantiene alrededor de un valor máximo constante (alrededor de 26 g/L) a partir de las 15 h.

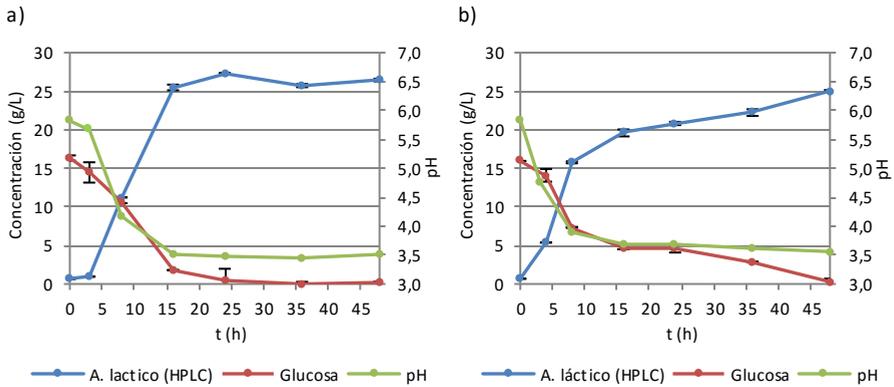


Figura III-8. Parámetros del metabolismo *L. plantarum* (a) y *P. pentosaceus* (b): consumo de glucosa, producción de ácido y cambio de pH

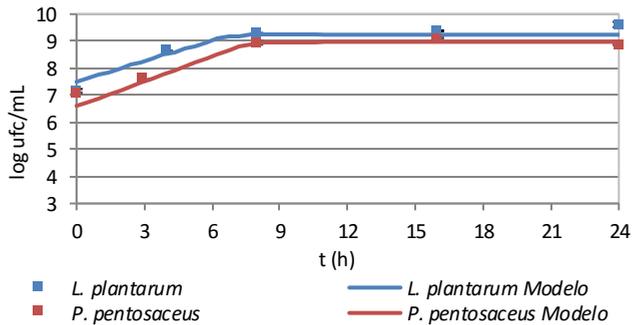


Figura III-9. Curvas de crecimiento de *L. plantarum* y *P. pentosaceus* con tiempos de fermentación seleccionados

En el caso de *P. pentosaceus* (Figura III-8b), la velocidad de consumo de glucosa, y por tanto de producción de ácido, fue más lenta, como se comentó anteriormente al analizar los espectros cromatográficos de la Figura III-7. La concentración de ácido láctico aumentó

de manera constante desde las 8 h hasta las 48 h, sin alcanzar un valor asintótico como en el caso de *L. plantarum*.

El pH mostró una tendencia acorde a la producción de ácido de las cepas, según se observa en la Figura III-8. Con ambos microorganismos se produjo una disminución del pH desde el inicio de la fermentación hasta las 15 h. A partir de este tiempo, en el caso de *L. plantarum* (Figura III-8a), el valor del pH se mantuvo estable alrededor de 3,5, mientras que en el caso de *P. pentosaceus* (Figura III-8b), el valor de pH continuó disminuyendo ligeramente debido a que no se detuvo la producción de ácido como puede observarse en la curva correspondiente a la concentración de ácido. Aunque la producción de ácido láctico fue considerablemente menor con *P. pentosaceus*, el pH final medio con los dos microorganismos fue similar (pH 3,5 con *L. plantarum* y pH 3,6 *P. pentosaceus*). Esto se debe a que el ácido láctico es un ácido débil ($K_a = 1,4 \times 10^{-4}$ a 25°C), por lo cual aunque existe una diferencia importante en la concentración de ácido (especialmente a partir de las 15 horas) el efecto sobre el pH es reducido dada la poca diferencia que se produciría en la concentración de iones H^+ en el medio.

Los resultados obtenidos para la concentración de ácido láctico en el caso de *L. plantarum* fueron, en general, inferiores a los observados por Jurado-Gómez et al. (2014) quienes analizaron la producción de este ácido en MRS utilizando dos cepas diferentes de este microorganismo. Por ejemplo, estos autores observaron concentraciones de ácido láctico (determinadas por HPLC) a las 18 h de fermentación de 17,75 g/L y 16,73 g/L para las cepas estudiadas, aunque se debe considerar que se utilizó una temperatura menor, de 32°C. En el caso del *P. pentosaceus*, Anastasiadou et al. (2008) caracterizaron la fermentación de una cepa de *P. pentosaceus*, detectando valores de ácido láctico de 9,20 g/L a las 12 horas de fermentación en MRS a una temperatura de 30°C. Estos valores son inferiores a los detectados por HPLC-DAD, pero cabe destacar que la temperatura de incubación empleada fue distinta, y que los autores evaluaron la concentración de ácido láctico por espectrofotometría mediante un kit enzimático.

Los ácidos son los principales compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias ácido-lácticas, por lo cual, de cara a la producción de bioconservantes, convendría maximizar su concentración. Por otro lado, en la producción de cultivos starter, la concentración de biomasa debe mantenerse en un valor alto para un aprovechamiento eficaz del proceso de fermentación. Considerando los resultados de esta sección se podrían ajustar los tiempos de fermentación necesarios para alcanzar un compromiso entre concentración de biomasa y de ácidos, tanto para la producción de starters como de bioconservantes. En el establecimiento del tiempo óptimo de fermentación debe considerarse las implicaciones económicas y operativas de establecer fermentaciones largas, como el aumento del consumo energético y del tiempo de producción.

En base a estos planteamientos, la producción del cultivo starter de *L. plantarum* podría detenerse a partir de las 16 h, ya que a partir de este tiempo, la concentración de microorganismos (Figura III-9) y la concentración de ácido láctico (Figura III-8a) se mantienen en un valor máximo que continúa hasta las 24 h. En el caso de *P. pentosaceus* no se obtiene una concentración de ácidos máxima, sino que aumenta de forma constante durante el periodo de estudio, mientras que la máxima densidad poblacional se alcanza a las 8 h. Considerando que a las 48 h se observó un descenso de los recuentos posiblemente debido a que el microorganismo se encuentra en fase de declive, la fermentación tendría que detenerse a tiempos menores, por ejemplo a las 36 h.

Por motivos prácticos, y para los análisis posteriores, se estableció un tiempo de fermentación de 24 h con ambas cepas. Así, se aseguraría la obtención de la mayor concentración posible de microorganismos viables para ambos cultivos. En cuanto a la concentración de ácido láctico, en el caso del *L. plantarum*, se garantizaría que se ha alcanzado su valor máximo, mientras que para el *P. pentosaceus*, aunque su concentración no sería la máxima, se evitaría prolongar la fermentación durante más tiempo, lo cual no es deseable desde un punto de vista operacional y económico. Convendría en este caso

modificar otras variables del proceso de producción (por ejemplo la temperatura) para determinar si la producción de ácidos aumentaría.

Considerando que el método de filtración permite separar la biomasa activa de los metabolitos (apartado III.4.1), se utilizará esta técnica para la estabilización de los caldos de fermentación. De este modo quedarían definidas las primeras etapas del proceso de elaboración de los bioconservantes: una fermentación en MRS a 37°C por 24 h, seguida de una filtración, obteniéndose el extracto libre de células (CFE) del microorganismo (denominado L-24F, en el caso de *L. plantarum* y P-24F en el caso de *P. pentosaceus*) y por otra parte, la biomasa con las células vivas para la elaboración de starters.

III.4.2.2 Determinación de la presencia de bacteriocinas

En base a los resultados del apartado anterior, para la determinación de la presencia de bacteriocinas se utilizó el caldo de fermentación filtrado (CFE) de 24 h de fermentación de *L. plantarum* y *P. pentosaceus* (L-24F y P-24F). La presencia de bacteriocinas se estudió de forma cuantitativa a través de la densidad óptica (OD), de manera que se pudiera determinar si estos compuestos contribuyen a la actividad antimicrobiana observada. Si bien la actividad antimicrobiana debida a bacteriocinas se estudió en el apartado III.4.1, aquí se demuestra su presencia o no en los CFE neutralizados.

Los CFE de 24 h de *L. plantarum* y *P. pentosaceus* (Tabla III-5), una vez neutralizados, no tuvieron un efecto inhibitorio sobre *L. innocua*, dado que se produjo crecimiento de este microorganismo (aumento de OD), descartándose entonces que exista actividad bacteriostática o bactericida debida a bacteriocinas.

Tabla III-5. Actividad antimicrobiana sobre *L. innocua* medida a través de los cambios de densidad óptica (OD) de los CFEs

Muestra	OD (600 nm)	
	Inicio (t = 0 h)	Final (t = 5 h)
L-24F (50%)	0,105±0,003	0,348±0,001
P-24F (50%)	0,108±0,001	0,384±0,001
Blanco - TSB	0,087±0,003	0,093±0,002
Control - <i>L. innocua</i>	0,096±0,006	0,708±0,004

L/P-24F: Extracto libre de células (CFE) de *L. plantarum* (L) / *P. pentosaceus* (P) de 24 h de fermentación

Estos resultados confirman los obtenidos en el apartado III.4.1, demostrando que a las 24 horas no existe presencia de bacteriocinas o que estas se encuentran presentes a concentraciones muy bajas. Aunque en el apartado III.4.1.1 se obtuvo actividad antimicrobiana con L-14, debida posiblemente a bacteriocinas, la reducción en los recuentos de *L. innocua* fue escasa (Tabla III-3). Recuérdese que las bacteriocinas producidas podrían haber desaparecido por efecto de las enzimas proteolíticas o haberse inactivado por agregación, como se comentó en la sección III.4.1.1.

Se debe considerar que no todas las cepas de BAL son capaces de producir bacteriocinas. En diversos estudios se ha encontrado que sólo algunas cepas del total de la población de BAL aisladas de diferentes alimentos, poseen actividad antimicrobiana debida a bacteriocinas (Cintas, Casaus, Håvarstein, Hernández, & Nes, 1997; Jiménez-Díaz et al., 1993; Schillinger & Lucke, 1989), e incluso se han observado variaciones entre cepas de una misma especie en cuanto a su capacidad de producirlas.

Aunque una cepa sea bacteriocinogénica, la producción de bacteriocinas depende de diversos factores (Sharma et al., 2010), entre los cuales se encuentra la composición del medio. Son diversos los estudios en los que se busca maximizar la producción de estos compuestos, en base a modificaciones de la composición de medios de cultivo comerciales o en la formulación de un medio experimental con un contenido óptimo de nutrientes. Muchos de estos estudios apuntan que la producción de bacteriocinas se estimula al aumentar la concentración de fuentes de nitrógeno complejas. Así lo reportaron Guerra

et al. (2001) al estudiar la producción de nisina y pediocina por parte de *L. lactis* y *P. acidilactici*, respectivamente. Verellen et al. (1998) observaron una alta producción de plantaricina 423 por parte de *L. plantarum* 423 cuando el medio MRS se suplementó con peptona bacteriológica. Todorov et al. (2011) indicaron que se requiere triptona para la producción óptima de bacteriocinas por parte de *L. plantarum* ST16Pa. Guerra y Pastrana (2001) demostraron que la producción de pediocina, por *P. acidilactici*, era tanto mayor cuanto más alta era la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo. Además, observaron que la triptona y el extracto de levadura tienen una influencia positiva en la producción de nisina por parte de *L. lactis*, aunque con cantidades altas se produce una reducción de su concentración. Así, los aminoácidos y péptidos ejercen un rol en el medio de cultivo que va más allá de servir como nutrientes para el crecimiento de los microorganismos. Pueden estimular la producción de bacteriocinas debido a que funcionan como inductores enzimáticos, y además se necesitan para sintetizar el anillo de lantionina en el caso de los lantibióticos (Vázquez, Cabo, González, & Murado, 2004).

La fuente de carbono también influiría en la producción de bacteriocinas. Altas concentraciones de glucosa, además de extracto de levadura y triptona serían necesarias para aumentar la concentración de pediocina ACh (Yang & Ray, 1994). Otros componentes del medio, como K_2HPO_4 y KH_2PO_4 influyen también en la producción de bacteriocinas (con un efecto variable en función de la concentración) así como el citrato de amonio y las sales de Mg y Mn (Biswas, Ray, Johnson, & Ray, 1991; Todorov et al., 2011). La sal puede tener un efecto positivo (Jiménez-Díaz et al., 1993), probablemente debido a que favorece la desorción de las bacteriocinas de las células, facilitando su liberación (Leal-Sánchez, Jiménez-Díaz, Maldonado-Barragán, Garrido-Fernández, & Ruiz-Barba, 2002).

Aparte de la composición del medio, se ha observado que la producción de bacteriocinas mantiene una relación con el número de células del microorganismo productor (Leal-Sánchez et al., 2002; Sharma et al., 2010), aunque no ocurre en todos los casos (da Silva Sabo et al., 2015). La estabilidad de las bacteriocinas podría disminuir en las diferentes etapas de la curva de crecimiento por la acción de las proteasas o porque

las bacteriocinas podrían verse afectadas por las condiciones ácidas del medio cuando la fermentación se encuentra avanzada (Daeshel, McKenney, & McDonald, 1990), ya que el pH influye en la degradación proteolítica. El pH afecta además la agregación y la adsorción de bacteriocinas a las células (Sharma et al., 2010).

En diversos estudios se ha observado un efecto importante del pH en la producción de bacteriocinas. Todorov et al. (2011) observaron que un pH inicial para *L. plantarum* ST16Pa de 6,0-6,5 era mucho mejor en cuanto a la producción de bacteriocinas y biomasa, en comparación con la obtenida a pH 4,5. Por otro lado, en varios estudios se ha determinado el efecto de mantener el pH de la fermentación en un valor constante, observándose resultados diversos. Yang y Ray (1994) observaron que mantener el pH de la fermentación en un valor constante, producía un efecto considerable sobre la producción de bacteriocinas, siendo diferente al pH óptimo de crecimiento, dependiendo de la bacteriocina en cuestión. Vázquez et al. (2004) observaron que ajustar el pH (por etapas) durante la fermentación produjo mayor cantidad de bacteriocinas, apuntando a un posible efecto autoestimulador de los microorganismos para la producción de bacteriocinas. Jiménez-Díaz et al. (1993), en un estudio similar, observaron que mantener el pH en 4,0 o 7,0 ejercía un efecto negativo en la producción de bacteriocinas; en cambio, mantener el pH sin control y añadir 4% de sal incrementaba su actividad.

En resumen, diversos factores que interactúan entre sí, afectan la producción de bacteriocinas. Para optimizar la producción de estos compuestos durante la fermentación suelen emplearse diseños de experimentos y el análisis de superficie de respuesta (Delgado et al., 2007; Leal-Sánchez et al., 2002; Pérez Guerra & Pastrana Castro, 2002). Dependiendo del diseño y de las condiciones estudiadas pueden establecerse los valores ideales de la concentración del inóculo y la temperatura de fermentación, además de optimizar la composición del medio, entre otros.

La producción y aislamiento de bacteriocinas, así como su aplicación en alimentos, se han estudiado extensamente. Desde un punto de vista práctico, dada la complejidad de los procesos de purificación de estos compuestos y los bajos rendimientos usualmente

conseguidos, resulta interesante la utilización de los caldos de fermentación crudos. Por otra parte, muchas bacteriocinas son activas únicamente sobre bacterias Gram positivas, de manera que la inclusión de otros compuestos antimicrobianos como los ácidos orgánicos, ampliaría el espectro de acción hacia las Gram-negativas (Niku-Paavola, Laitila, Mattila-Sandholm, & Haikara, 1999). Además, las diferentes sustancias activas podrían ejercer un efecto sinérgico (Hartmann et al., 2011).

III.4.2.3 Determinación de peróxido de hidrógeno

Otro producto del metabolismo microbiano que puede presentar actividad antimicrobiana es el peróxido de hidrógeno. En el presente estudio, se determinó su presencia en los caldos de fermentación, con la finalidad de establecer si este metabolito contribuía a la capacidad antimicrobiana observada con los dos microorganismos en estudio.

No se obtuvo presencia de dicho compuesto. Aunque los microorganismos sean capaces de producirlo, según Rodríguez et al. (1997), el H₂O₂ producido en MRS se degrada rápidamente debido al alto contenido de glucosa del medio, por lo cual, a medida que transcurre el proceso de fermentación en caso de estar presente, tendería a desaparecer. Por otra parte, la formación de peróxido de hidrógeno se asocia a condiciones de fermentación aerobias en el medio de crecimiento (Hartmann et al., 2011; Loubiere, Coccagn-Bousquet, Matos, Goma, & Lindley, 1997), por lo tanto, es poco probable que se produzca en las condiciones de fermentación utilizadas en este estudio dado que no se sometió el cultivo a agitación o al contacto con el aire, si bien las condiciones no fueron estrictamente anaeróbicas.

La producción de peróxido de hidrógeno también podría estar afectada por la composición del medio, como ha sido observado por Hartmann et al. (2011) en el caso del *Lactobacillus curvatus* IDE0444. De cualquier modo, a pesar de su capacidad antimicrobiana, la presencia de peróxido de hidrógeno es indeseable, puesto que podría

ocasionar cambios inaceptables en el color y sabor del alimento (Hartmann et al., 2011; Juven, Weisslowicz, & Harel, 1988).

III.4.3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Letal (CML) de los extractos libres de células (CFE)

Como se mencionó en el apartado anterior, los CFEs de 24 h de fermentación, L-24F y P-24F, se seleccionaron para la elaboración de productos bioconservantes. La caracterización del poder antimicrobiano de ambos se realizó en términos de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y de la concentración mínima letal (CML) frente a diferentes microorganismos diana. En la Tabla III-6 se observa que al comparar la carga inicial del microorganismo diana con el recuento residual obtenido para cada concentración de L-24F, la concentración mínima inhibitoria y letal fue la misma para las tres microorganismos, obteniéndose CMI = 20% y CML = 30%. En el caso de P-24F, haciendo el mismo análisis, se obtuvo que para los tres microorganismos diana, la CMI fue 30%, mientras que la CML para el caso de *L. innocua* y *L. monocytogenes* fue 50%, y para *E. coli*, 40%.

Tabla III-6. Actividad antimicrobiana de los caldos de *L. plantarum* (L) y *P. pentosaceus* (P) sobre *L. innocua*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, en base a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Letal (CML).

CFE	Microorganismo diana	CMI		CML		Control microorg. diana	
		% v/v	log ufc/mL residual	% v/v	log ufc/mL residual	Inicial (ufc/mL)	Final (ufc/mL)
L-24F	<i>L. innocua</i>	20	5,52±0,01	30	-	5,69±0,04	7,99±0,01
	<i>E. coli</i> O157:H7	20	5,29±0,01	30	-	5,95±0,01	8,93±0,05
	<i>L. monocytogenes</i>	20	5,39±0,04	30	2,70±0,03	5,70±0,08	8,56±0,02
P-24F	<i>L. innocua</i>	30	5,82±0,04	50	-	5,69±0,04	7,99±0,01
	<i>E. coli</i> O157:H7	30	5,53±0,02	40	1,65±0,01	5,95±0,01	8,93±0,05
	<i>L. monocytogenes</i>	30	5,06±0,10	50	1,22±0,06	5,70±0,08	8,56±0,02

L-24F/P24F: Extracto libre de células (CFE) de *L. plantarum*/*P. pentosaceus*.

Como se ha comentado en apartados anteriores, la diferencia en la capacidad antimicrobiana de *L. plantarum* y *P. pentosaceus* estaría relacionada con las diferencias en la producción de ácido láctico. En efecto, a las 24 h de fermentación, los niveles de ácido láctico fueron 24% menores en los CFEs procedentes de *P. pentosaceus*, siendo de $20,8 \pm 0,2$ g/L frente a los $27,3 \pm 0,1$ g/L de *L. plantarum* (Figura III-8). Esta diferencia en la concentración de ácido se refleja en el pH del medio. Así, según la Figura III-8, después de 24 h de fermentación el pH del caldo de *L. plantarum* (sin filtrar, L-24) fue $3,47 \pm 0,02$, mientras que en el de *P. pentosaceus* (sin filtrar, P-24) se obtuvo un pH de $3,68 \pm 0,02$ para el mismo tiempo de fermentación.

Los ácidos orgánicos deben su poder antimicrobiano al descenso del pH y al efecto de la forma no disociada del ácido (Leroy & De Vuyst, 2001; W. Lin et al., 2009). A nivel celular, inducen la disrupción de la membrana, inhibición de reacciones metabólicas y dificultad en mantener el pH homeostático (Choi et al., 2009). Tanto *L. monocytogenes* como *E. coli* son microorganismos capaces de sobrevivir en entornos ácidos. Sobre el efecto del pH, Shabala et al. (2008), estudiando las condiciones de desarrollo de *L. monocytogenes*, observaron que algunas cepas eran capaces de crecer hasta en un pH mínimo de 4,1; aunque en condiciones normales para cepas no estresadas, el pH mínimo sería 4,4 (Hwang et al., 2014). Este microorganismo sobrevive en ambientes acídicos debido a diferentes mecanismos de adaptación, que pueden activarse en condiciones de pH ácido moderado (Gandhi & Chikindas, 2007). En el caso de *E. coli* O157:H7, Lin et al. (1996) señalan que posee mecanismos de resistencia que le permite adaptarse a entornos ácidos, siendo capaz de sobrevivir en condiciones de pH extremas (hasta pH = 2), factor fundamental en su patogenicidad, ya que le permite sobrevivir a las condiciones ácidas del estómago. Estos mismos autores señalan que se debe considerar que la activación de los diferentes mecanismos de resistencia de *E. coli* O157:H7 depende de una serie de factores, que involucran la disponibilidad de ciertos sustratos y la adaptación previa de la cepa a las condiciones de crecimiento del medio.

III.4.4 Determinación de la actividad antimicrobiana de los productos deshidratados elaborados a partir de los extractos libres de células (CFEs)

En esta última fase se obtuvo el producto en polvo mediante dos técnicas de secado: atomización y liofilización (ver apartado III.3.4.1).

III.4.4.1 Determinación del contenido de sólidos totales

Se determinó el contenido de sólidos totales de la mezcla de L-24F o P-24F con los soportes, dextrina (D) o maltodextrina (M). Para ello, se adicionó un 10% p/v del soporte al caldo de fermentación, se homogeneizó y se realizó el procedimiento descrito en el apartado III.3.4.2.1 para obtener el contenido de sólidos totales de las mezclas, indicado en la Tabla III-7. Esto se hizo para conocer la cantidad de agua a añadir a los productos deshidratados y así poder reconstituirlos para determinar su actividad antimicrobiana por el método de dilución en caldo (descrito en el apartado III.3.3).

Tabla III-7. Contenido de sólidos totales (%p/v) de los extractos libres de células (CFE) de 24 horas de fermentación de *L. plantarum* (L-24F) y *P. pentosaceus* (P-24F) con 10%p/v de dextrina (D) o maltodextrina (M)

CFE	Sólidos totales	
	D	M
L-24F	13,2±0,1	13,8±0,1
P-24F	13,1±0,1	13,8±0,1

III.4.4.2 Actividad antimicrobiana “in vitro”

Se caracterizó la actividad antimicrobiana *in vitro* (en base a la CMI y la CML) de los productos en polvo obtenidos mediante atomización y liofilización, utilizando como microorganismo diana *L. innocua*. Posteriormente, se realizó el mismo análisis en los productos en polvo seleccionados, empleando *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* (metodología descrita en el apartado III.3.3).

III.4.4.2.1 Actividad antimicrobiana de los CFE atomizados

Las propiedades antimicrobianas sobre *L. innocua* de los caldos estabilizados por atomización (L-24FA y P-24FA) se muestran en la Tabla III-8. Puede observarse que el uso de dextrina (D) o maltodextrina (M) no produjo diferencias en la CMI y CML. Al comparar los resultados obtenidos de CMI y CML de L-24FA con los del caldo antes de atomizar y sin añadir el soporte (L-24F, en la Tabla III-6), se aprecia que hay una reducción de estos parámetros del 10% después del proceso de atomización. En el caso de los productos P-24FA (con D o M como soportes) indicados en la Tabla III-8, la CMI mantuvo el mismo valor que sobre el caldo sin soporte (Tabla III-6), mientras que la CML aumentó en 10%.

Tabla III-8. Actividad antimicrobiana (CMI y CML) sobre *L. innocua* de los CFE de *L. plantarum* y *P. pentosaceus* deshidratados por atomización, empleando dextrina (D) o maltodextrina (M) como soportes

Producto	T (°C)	Soporte	CMI		CML		Control <i>L. innocua</i>	
			% v/v	ufc/mL residual	% v/v	ufc/mL residual	Inicio (ufc/mL)	Final (ufc/mL)
L-24FA	85	D	30	4,59±0,05	40	-	5,67±0,09	8,526±0,004
		M	30	4,69±0,01	40	-	5,67±0,09	8,526±0,004
	110	D	30	4,69±0,01	40	-	5,75±0,04	8,08±0,04
		M	30	5,33±0,00	40	-	5,70±0,07	8,04±0,08
P-24FA	85	D	30	5,40±0,03	60	-	5,54±0,05	8,05±0,03
		M	30	5,33±0,07	60	-	5,54±0,05	8,05±0,03
	110	D	30	5,55±0,04	60	-	5,63±0,01	8,41±0,05
		M	30	5,56±0,03	60	-	5,70±0,07	8,04±0,08

L-24FA/P24FA: Extracto libre de células (CFE) de *L. plantarum*/*P. pentosaceus* secado por atomización.

Dados estos resultados sobre *L. innocua*, se seleccionaron las siguientes condiciones para los ensayos de actividad antimicrobiana sobre los microorganismos patógenos *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7:

a) Se eligió dextrina como único soporte a testar para simplificar el estudio, tomando en cuenta que no existen diferencias en la actividad antimicrobiana debido al soporte.

b) En el caso de los productos atomizados, la temperatura de salida se fijó en 85°C debido a que conlleva un consumo energético menor.

La actividad antimicrobiana de los productos en polvo seleccionados (L-24FA y P-24FA) sobre *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, se observa en la Tabla III-9. Las CMI y CML fueron iguales a las obtenidas con *L. innocua* (Tabla III-8), de manera que el efecto antimicrobiano de cada producto se mantiene igual sobre los tres microorganismos diana.

Tabla III-9. Actividad antimicrobiana (CMI y CML) sobre *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* de los CFE deshidratados por atomización (dextrina como soporte) provenientes de los caldos de fermentación de *L. plantarum* y *P. pentosaceus*

Producto (+10% dextrina)	Microorganismo diana	CMI		CML		Control microorg. diana	
		% v/v	ufc/mL residual	% v/v	ufc/mL residual	Inicio (ufc/mL)	Final (ufc/mL)
L-24FA	<i>E. coli</i> O157:H7	30	4,94±0,01	40	-	5,74±0,02	9,02±0,05
	<i>L. monocytogenes</i>	30	3,71±0,01	40	-	5,67±0,04	8,78±0,01
P-24FA	<i>E. coli</i> O157:H7	30	5,91±0,01	60	-	5,74±0,02	9,02±0,05
	<i>L. monocytogenes</i>	30	5,44±0,05	60	-	5,67±0,04	8,78±0,01

L-24FA/P24FA: Extracto libre de células (CFE) de *L. plantarum*/*P. pentosaceus* secado por atomización.

III.4.4.2.2 Actividad antimicrobiana de los CFE liofilizados

El efecto antimicrobiano de los productos liofilizados de los CFE de *L. plantarum* y *P. pentosaceus* (L-24FR y P-24FR) (Tabla III-10) fue el mismo que el observado en los productos atomizados (Tabla III-8). No se observaron diferencias en la CMI y CML en cuanto al soporte utilizado (D o M).

Tabla III-10. Actividad antimicrobiana (CMI y CML) sobre *L. innocua* de los productos obtenidos a partir de los CFE de *L. plantarum* y *P. pentosaceus*, liofilizados utilizando dextrina (D) o maltodextrina (M) como soporte

Producto	Soporte	CMI		CML		Control <i>L. innocua</i>	
		% v/v	ufc/mL residual	% v/v	ufc/mL residual	Inicio (ufc/mL)	Final (ufc/mL)
L-24FR	D	30	4,62±0,01	40	1,45±0,10	5,67±0,05	8,760±0,002
	M	30	4,43±0,01	40	-	5,66±0,10	8,10±0,03
P -24FR	D	30	5,36±0,02	60	-	5,67±0,04	8,17±0,04
	M	30	4,77±0,05	60	-	5,67±0,04	8,17±0,04

L-24FR/P24FR: Extracto libre de células (CFE) de *L. plantarum*/*P. pentosaceus* secado por liofilización.

Los valores obtenidos de la CMI y CML de los CFE liofilizados sobre los microorganismos patógenos (Tabla III-11) son los mismos obtenidos para el caso de *L. innocua* (Tabla III-10). Además, son iguales a los obtenidos por atomización (Tabla III-9).

Tabla III-11. Actividad antimicrobiana (CMI y CML) sobre *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* de los caldos de *L. plantarum* y *P. pentosaceus* deshidratados por liofilización (dextrina como soporte)

Producto (+10% dextrina)	Microorganismo <i>diana</i>	CMI		CML		Control <i>microorg. diana</i>	
		% v/v	ufc/mL residual	% v/v	ufc/mL residual	Inicio (ufc/mL)	Final (ufc/mL)
L-24FR	<i>E. coli</i> O157:H7	30	5,40±0,03	40	-	5,74±0,02	9,02±0,05
	<i>L. monocytogenes</i>	30	3,59±0,03	40	-	5,67±0,04	8,78±0,01
P -24FR	<i>E. coli</i> O157:H7	30	5,68±0,06	60	-	5,74±0,02	9,02±0,05
	<i>L. monocytogenes</i>	30	5,10±0,01	60	-	5,67±0,04	8,78±0,01

L-24FR/P24FR: Extracto libre de células (CFE) de *L. plantarum*/*P. pentosaceus* secado por liofilización.

Los resultados obtenidos, indican que no existen diferencias en cuanto a la técnica de estabilización. Por lo tanto, para fines prácticos, se seleccionó la liofilización (con dextrina como soporte) como única técnica de estabilización para los ensayos posteriores, considerando además que en los equipos de laboratorio empleados para la atomización y la liofilización, se observó que en el primer caso se obtenían pérdidas mayores de producto

en comparación con la liofilización, obteniéndose con esta última un rendimiento prácticamente del 100%.

III.4.4.3 Actividad antimicrobiana “in vivo” sobre *L. innocua* (Challenge tests)

La determinación de la actividad antimicrobiana *in vivo* se realizó en carne picada de cerdo inoculada con una concentración de 10^2 ufc/g de *L. innocua*. El producto antimicrobiano en polvo ensayado se obtuvo a partir del CFE de 24 h liofilizado de *L. plantarum* o *P. pentosaceus* (L-24FR o P-24FR). Se testaron concentraciones de 0, 40, 50 y 60 g de bioconservante en polvo/kg de carne; dichas cantidades fueron establecidas para que incluyeran la CMI y la CML resultantes de las pruebas de actividad antimicrobiana *in vitro* (apartado III.4.4.2.2).

En la Figura III-10 se aprecian los cambios en la población de *L. innocua* según la concentración de los bioconservantes L-24FR (a) y P-24FR (b). El efecto antimicrobiano es evidente para todas las concentraciones ensayadas, observándose una amplia diferencia en los recuentos de la muestra control y las muestras tratadas con los bioconservantes, aunque estas no fueron evidentes los primeros días de almacenamiento.

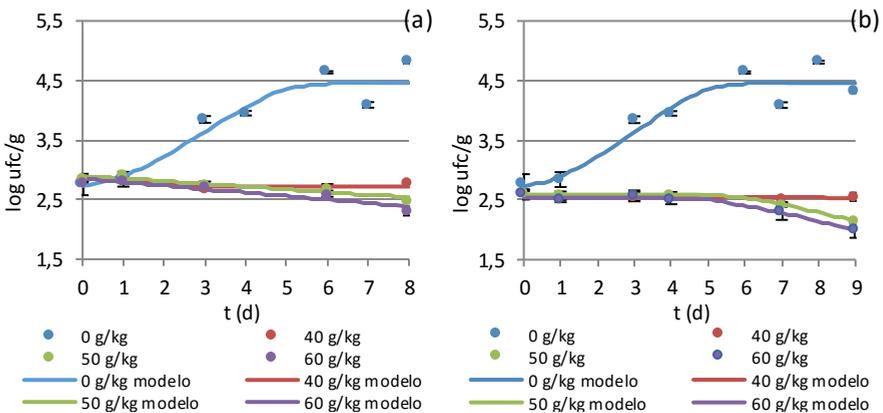


Figura III-10. Efecto antimicrobiano de los CFE liofilizados L-24FR (a) y P-24FR (b) sobre *Listeria innocua* en carne picada de cerdo

Los parámetros de crecimiento obtenidos a partir de las curvas modelizadas se indican en la Tabla III-12. En el caso de la muestra control (0 g/kg), se obtuvo una y_f de $4,5 \pm 0,1$ log ufc/g a partir del sexto día, mientras que en el caso de las muestras con bioconservante (40, 50 o 60 g/kg) se produjo un descenso continuo de la población microbiana (velocidad de crecimiento negativa) hasta alcanzar unos recuentos finales promedio de $2,5 \pm 0,2$ log ufc/g en el caso de L-24FR y $2,2 \pm 0,3$ log ufc/g con P-24FR, lo cual representa una reducción de aproximadamente 2 unidades logarítmicas con respecto al valor de y_f de la muestra control. Aunque las diferencias entre las concentraciones utilizadas son pequeñas, los recuentos obtenidos tienden a ser inferiores cuanto mayor es la concentración de bioconservante L-24FR o P-24FR.

Tabla III-12. Parámetros de crecimiento de *L. innocua* en función de la concentración de los extractos libres de células (CFE) liofilizados de *L. plantarum* o *P. pentosaceus* (L-24FR o P-24FR) en carne picada de cerdo

Pro-ducto	Conc. (g/kg)	y_0 (log ufc·g ⁻¹)	y_f (log ufc·g ⁻¹)	λ / S (d)	μ_{max} / K_{max} (log ufc·g ⁻¹ ·d ⁻¹)	SE	R ²
L-24F	0*	2,729 ± 0,183	4,456 ± 0,096	0,885 ± 1,222	0,427 ± 0,16	0,264	0,879
	40*	2,86 ± 0,037	2,717 ± 0,027	-	-0,051 ± 0,04	0,0558	0,504
	50*	2,897 ± 0,034	-	-	-0,045 ± 0,007	0,0678	0,812
	60*	2,849 ± 0,037	-	-	-0,058 ± 0,008	0,074	0,858
P-24F	0*	2,729 ± 0,183	4,456 ± 0,096	0,885 ± 1,222	0,427 ± 0,16	0,264	0,879
	40**	2,563 ± 0,024	-	-	-0,0033 ± 0,0046	0,0506	0,1173
	50*	2,589 ± 0,015	-	5,879 ± 0,403	-0,142 ± 0,023	0,0435	0,939
	60*	2,544 ± 0,031	-	5,156 ± 0,925	-0,142 ± 0,04	0,0814	0,874

*Modelo de Baranyi y Roberts, **Modelo lineal.

Al comparar estos resultados (*in vivo*), con los obtenidos *in vitro* para *L. innocua* (Tabla III-10), se observa que los bioconservantes L-24FR y P-24FR no produjeron un efecto letal

en la matriz cárnica de la misma magnitud que en medio de cultivo (aun cuando se utilizaron concentraciones similares de bioconservante), puesto que se mantuvo una población residual de *L. innocua*, a diferencia de lo observado en medio de cultivo. Hartmann et al. (2011) encontraron resultados similares, resaltando que el poder antimicrobiano de los caldos de fermentación de diferentes BAL fue de 3 a 10 veces mayor en medio de cultivo que en carne picada, lo cual lo atribuyen a la inactivación por enzimas (en el caso de las bacteriocinas) o a interacciones con componentes específicos del alimento. En el caso de L-24FR y P-24FR, en el capítulo anterior se demostró que su capacidad antimicrobiana se atribuye al ácido láctico. Aunque los tratamientos con ácidos son capaces de reducir la carga microbiana en la carne, los microorganismos que sobreviven a dichos tratamientos probablemente se encuentran dañados o estresados, con alteraciones en su estado fisiológico y en su capacidad de multiplicarse (Hwang et al., 2014). Esto explicaría por una parte, la reducción en la población microbiana observada cuando se aplicó los bioconservantes, y por otra, la presencia de una población residual que decrece en el tiempo, como se observa en las curvas de 20, 30 y 40 g/kg de la Figura III-10 (a y b). En la Figura III-11 se observa que la incorporación de ambos bioconservantes produjo una notoria reducción en el pH, manteniéndose en ambos casos entre 5,1 y 5,2, siendo ligeramente superiores para el caso de P-24F debido a que su concentración de ácido es menor, como se demostró en el apartado III.4.2.1. En un alimento con estos valores de pH *Listeria monocytogenes* sería capaz de desarrollarse, dado que su pH mínimo de crecimiento en alimentos es 4,6 - 5,0 (European Commission: Health & Consumer Protection Directorate-General, 1999), aunque su capacidad de multiplicarse se reduciría, como se observa en la Figura III-10 para el caso análogo de *L. innocua*. Sin embargo, debe considerarse que *L. monocytogenes* podría crecer a pH inferior si la cepa ha podido adaptarse a condiciones de pH más bajas (Hwang et al., 2014), pudiendo sobrevivir por ejemplo a pH de 4,3 - 4,5 en salami, según lo indican Shabala et al. (2008).

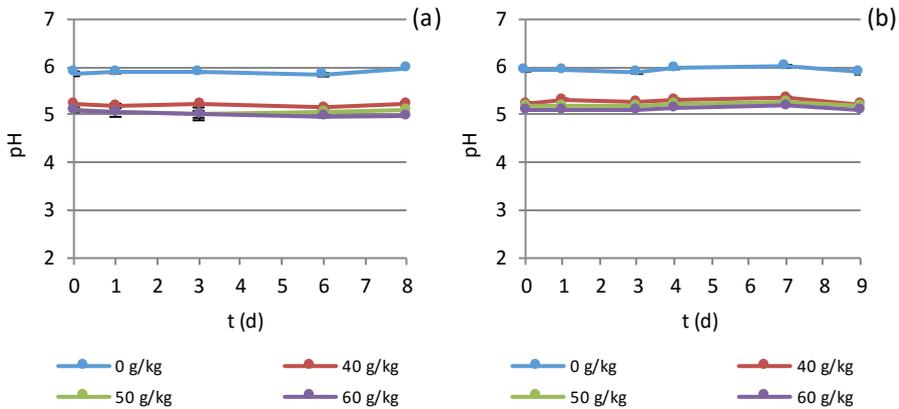


Figura III-11. Cambios en el pH según la concentración de los CFE liofilizados L-24FR (a) o P-24FR (b) en carne picada de cerdo inoculada con *L. innocua*

III.5 CONCLUSIONES

- Los tratamientos de pasteurización y filtración son adecuados para estabilizar los caldos de fermentación de *L. plantarum* o *P. pentosaceus*, ya que tras su aplicación se conserva la capacidad antimicrobiana de los mismos. En cambio, la purificación parcial, debido a la neutralización de los ácidos, anula el poder antimicrobiano. Es preferible utilizar la filtración sobre la pasteurización, debido a que es un proceso rápido que mantiene inalteradas las características del caldo de fermentación, además de permitir utilizar la biomasa generada para producir cultivos starter, a diferencia de la pasterización, que es un proceso en que se matan los microorganismos por efecto del calor.
- Al comparar los microorganismos starter objeto del estudio, se observa que los caldos de fermentación de *L. plantarum* poseen una actividad antimicrobiana mayor que los de *P. pentosaceus*. Dicha actividad antimicrobiana puede atribuirse exclusivamente a la presencia de ácido láctico, ya que no se obtuvieron cantidades detectables de bacteriocinas o de peróxido de hidrógeno, posiblemente debido a la incapacidad de las cepas de producir estos compuestos, al menos en las condiciones estudiadas. En futuros

estudios se podría determinar el efecto de las variaciones del medio de cultivo o en las condiciones de incubación para determinar si es posible obtener bacteriocinas .

- Los procesos de estabilización por atomización y liofilización dieron en general lugar a una reducción de la capacidad antimicrobiana (CMI y CML) en comparación con los caldos antes del proceso de secado, lo cual se debe posiblemente al efecto de la disminución de la concentración de ácido por la adición del soporte. Para el mismo caldo de fermentación (*L. plantarum* o *P. pentosaceus*), no existen diferencias en la capacidad antimicrobiana entre los productos liofilizados o atomizados de modo que la concentración del ácido láctico es la misma con ambos procesos de secado. En futuras etapas de desarrollo, con vistas a la producción industrial, se deberá evaluar la factibilidad técnica y económica de ambos procesos de estabilización, tomando en cuenta que la atomización, conlleva tiempos de producción más cortos y consumo energético más bajo, aunque con mayor merma de producto. Adicionalmente, se deberá estudiar la vida útil del producto en polvo, tanto desde el punto de vista de su estabilidad fisicoquímica como de sus propiedades antimicrobianas.
- La concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima letal (CML) obtenidas en los estudios *in vitro* sirven de punto de partida para la evaluación de las propiedades antimicrobianas de los bioconservantes. Sin embargo, en los *challenge test*, los bioconservantes mostraron una actividad antimicrobiana inferior en relación a la obtenida en las pruebas *in vitro*, lo cual demuestra que el efecto antimicrobiano en una matriz cárnica es sustancialmente distinto. Por ello, es necesario ampliar el estudio hacia la determinación del efecto antimicrobiano sobre otros microorganismos, alterantes o patógenos encontrados en la carne, de modo que se pueda establecer la concentración más efectiva en la carne que permita prolongar su vida útil.

III.6 REFERENCIAS

- Ananou, S., Baños, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., & Valdivia, E. (2010). Effect of combined physico-chemical treatments based on enterocin AS-48 on the control of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in a model cooked ham. *Food Control*, 21(4), 478-486.
- Ananou, S., Muñoz, A., Martínez-Bueno, M., González-Tello, P., Gálvez, A., Maqueda, M., & Valdivia, E. (2010). Evaluation of an enterocin AS-48 enriched bioactive powder obtained by spray drying. *Food microbiology*, 27(1), 58-63.
- Anastasiadou, S., Papagianni, M., Filiouis, G., Ambrosiadis, I., & Koidis, P. (2008). Growth and metabolism of a meat isolated strain of *Pediococcus pentosaceus* in submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(6), 448-454.
- Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International journal of food microbiology*, 23, 277-294.
- Barry, A. L. (1976). *The antimicrobial susceptibility test: Principles and Practices*. London: Lea & Febiger.
- Biswas, S. R., Ray, P., Johnson, M. C., & Ray, B. (1991). Influence of Growth Conditions on the Production of a Bacteriocin, *Pediocin AcH*, by *Pediococcus acidilactici* H. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(4), 1265-7.
- Burgess, C. M., Rivas, L., McDonnell, M. J., & Duffy, G. (2008). Biocontrol of Pathogens in the Meat Chain. En F. Toldrá (Ed.), *Meat Biotechnology* (pp. 253-288). Springer Science & Business Media.
- Cabo, M., Murado, M., González, M., & Pastoriza, L. (1999). A method for bacteriocin quantification. *Journal of applied microbiology*, 87, 907-914.
- Carolissen-Mackay, V., Arendse, G., & Hastings, J. W. (1997). Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *International journal of food microbiology*, 34(1), 1-16.

- Choi, Y. M., Kim, O. Y., Kim, K. H., Kim, B. C., & Rhee, M. S. (2009). Combined effect of organic acids and supercritical carbon dioxide treatments against nonpathogenic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* and *E. coli* O157:H7 in fresh pork. *Letters in applied microbiology*, 49(4), 510-515.
- Cintas, L. M., Casaus, P., Håvarstein, L. S., Hernández, P. E., & Nes, I. F. (1997). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11), 4321-30.
- Corsetti, A., & Valmorri, S. (2011). *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus plantarum*. *Genetics*, 111-118.
- Crowley, S., Mahony, J., & van Sinderen, D. (2013). Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 33(2), 93-109.
- da Silva Sabo, S., Converti, A., Todorov, S. D., Domínguez, J. M., & de Souza Oliveira, R. P. (2015). Effect of inulin on growth and bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* in stationary and shaken cultures. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(4), 864-870.
- Daeshel, M. A., McKenney, M. C., & McDonald, L. C. (1990). Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. *Food Microbiology*, 7, 91-98.
- De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., ... Whitman, W. B. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume three The Firmicutes (Segunda ed). Springer.
- Delgado, A., Arroyo López, F. N., Brito, D., Peres, C., Fevereiro, P., & Garrido-Fernández, A. (2007). Optimum bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* 17.2b requires absence of NaCl and apparently follows a mixed metabolite kinetics. *Journal of biotechnology*, 130(2), 193-201.
- Delgado, A., Brito, D., Fevereiro, P., Tenreiro, R., & Peres, C. (2005). Bioactivity quantification of crude bacteriocin solutions. *Journal of microbiological methods*, 62(1), 121-124.
- European Commission: Health & Consumer Protection Directorate-General. (1999). Opinion of the

scientific committee on veterinary measures relating to public health on *Listeria monocytogenes*. Directorate B - Scientific Health Opinions.

Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., & Ben Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International journal of food microbiology*, 120(1-2), 51-70.

Gandhi, M., & Chikindas, M. L. (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International journal of food microbiology*, 113(1), 1-15.

Ghalfi, H., Benkerroum, N., Doguiet, D. D., Delvigne, F., & Thonart, P. (2007). Comparison of the performances of different fermentation strategies on cell growth and bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 541-549.

Giraud, E., Lelong, B., & Raimbault, M. (1991). Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 36, 96-99.

Guerra, N., & Pastrana, L. (2001). Enhanced nisin and pediocin production on whey supplemented with different nitrogen sources. *Biotechnology letters*, 23, 609-612.

Guerra, N., Rua, M., & Pastrana, L. (2001). Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey. *International journal of food microbiology*, 70, 267-281.

Hartmann, H. A., Wilke, T., & Erdmann, R. (2011). Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. *International journal of food microbiology*, 146(2), 192-199.

Hwang, C.-A., Sheen, S., Juneja, V., Hwang, C.-F., Yin, T.-C., & Chang, N.-Y. (2014). The influence of acid stress on the growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on cooked ham. *Food Control*, 37, 245-250.

ISO 15214:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria. Colony-count technique at 30 degrees C (1998). International Organization for Standardization (ISO).

- Jiménez-Díaz, R., Ríos-Sánchez, R. M., Desmazeaud, M., Ruiz-Barba, J. L., & Piard, J.-C. (1993). Plantaricins S and T, Two New bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 5(59), 1416-1424.
- Jurado-Gómez, H., Ramírez, C., & Aguirre, D. (2013). Cinética de la fermentación de *Lactobacillus plantarum* en un medio de cultivo enriquecido como potencial probiótico. *Veterinaria y Zootecnia*, 7(2), 37-53.
- Juven, B., Weisslowicz, H., & Harel, S. (1988). Detection of hydrogen peroxide produced by meat lactic starter cultures. *Journal of Applied Bacteriology*, 65, 357-360.
- Leal-Sánchez, M., Jiménez-Díaz, R., Maldonado-Barragán, A., Garrido-Fernández, A., & Ruiz-Barba, J. L. (2002). Optimization of bacteriocin production by batch fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4465-4471.
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2001). Growth of the Bacteriocin-Producing *Lactobacillus sakei* Strain CTC 494 in MRS Broth Is Strongly Reduced Due to Nutrient Exhaustion: a Nutrient Depletion Model for the Growth of Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), 4407-4413.
- Lin, J., Smith, M. P., Chapin, K. C., Baik, H. S., Bennett, G. N., & Foster, J. W. (1996). Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9), 3094-100.
- Lin, W.-H., Lin, C.-K., Sheu, S.-J., Hwang, C.-F., Ye, W.-T., Hwang, W.-Z., & Tsen, H.-Y. (2009). Antagonistic activity of spent culture supernatants of lactic acid bacteria against *Helicobacter pylori* growth and infection in human gastric epithelial AGS cells. *Journal of food science*, 74(6), 225-230.
- Loubiere, P., Coccagn-Bousquet, M., Matos, J., Goma, G., & Lindley, N. D. (1997). Influence of end-products inhibition and nutrient limitations on the growth of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Journal of Applied Microbiology*, 82(1), 95-100.

- Mani-López, E., García, H. S., & López-Malo, A. (2012). Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. *Food Research International*, 45(2), 713-721.
- Molin, G. (2010). *Lactobacillus plantarum* 299v. (S. Polska, Ed.) *Bibliotheca IPC: Probiotica*.
- Nielsen, J., Dickson, J., & Crouse, J. (1990). Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(7), 2142-2145.
- Niku-Paavola, M. L., Laitila, A., Mattila-Sandholm, T., & Haikara, A. (1999). New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of applied microbiology*, 86(1), 29-35.
- Parente, E., Brienza, C., Moles, M., & Ricciardi, A. (1995). A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity. *Journal of Microbiological Methods*, 22, 95-108.
- Parente, E., & Ricciardi, A. (1999). Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 628-638.
- Pérez Guerra, N., & Pastrana Castro, L. (2002). Production of bacteriocins from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 539 and *Pediococcus acidilactici* NRRL B-5627 using mussel-processing wastes. *Biotechnology and applied biochemistry*, 36, 119-125.
- Reglamento (CE) No. 2073/2005 de la comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos. (2005). *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 338, 26.
- Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N., & Penna, A. L. B. (2012). Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Engineering Reviews*, 4, 124-140.
- Rodríguez, J. M., Martínez, M. I., Suárez, A. M., Martínez, J. M., & Hernández, P. E. (1997). Research note: unsuitability of the MRS medium for the screening of hydrogen peroxide-producing lactic acid bacteria. *Letters in applied microbiology*, 25(1), 73-4.
- Schillinger, U., & Lucke, F.-K. (1989). Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* Isolated from Meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(8), 1901-1906.

- Shabala, L., Lee, S. H., Cannesson, P., & Ross, T. (2008). Acid and NaCl limits to growth of *Listeria monocytogenes* and influence of sequence of inimical acid and NaCl levels on inactivation kinetics. *Journal of food protection*, 71(6), 1169-1177.
- Sharma, S., Garg, A., & Singh, G. (2010). Optimization of Fermentation Conditions for Bacteriocin Production by *Lactococcus lactis* CCSULAC 1 on Modified MRS Medium. *International Journal of Dairy Science*, 5(1), 1–9.
- Stiles, M. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70(2-4), 331-345.
- Sung, S.-Y., Sin, L. T., Tee, T.-T., Bee, S.-T., Rahmat, A. R., Rahman, W. A. W. A., ... Vikhraman, M. (2013). Antimicrobial agents for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology*, 33, 110-123.
- Talon, R., & Leroy, S. (2011). Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentations. *Meat science*, 89, 303-309.
- Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2005). Pediocin ST18, an anti-listerial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* ST18 isolated from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. *Process Biochemistry*, 40(1), 365-370.
- Todorov, S. D., Dimitrov, F., Dora, B., & De Melo, G. (2010). *Lactobacillus plantarum*: Characterization of the species and a application in food production. *Food Reviews International*, 26, 205-229.
- Todorov, S. D., Prévost, H., Lebois, M., Dousset, X., LeBlanc, J. G., & Franco, B. D. G. M. (2011). Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*) — From isolation to application: Characterization of a bacteriocin. *Food Research International*, 44(5), 1351-1363.
- Turcotte, C., Lacroix, C., Kheadr, E., Grignon, L., & Fliss, I. (2004). A rapid turbidometric microplate bioassay for accurate quantification of lactic acid bacteria bacteriocins. *International journal of Food Microbiology*, 90, 283-293.
- UNE 34824:1983. Leche. Determinación del contenido en extracto seco total (1983). AENOR.

- Vázquez, J., Cabo, M., González, M., & Murado, M. (2004). The role of amino acids in nisin and pediocin production by two lactic acid bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(3-4), 319-325.
- Verellen, T. L. J., Bruggeman, G., Van Reenen, C. A., Dicks, L. M. T., & Vandamme, E. J. (1998). Fermentation optimization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 423. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86(2), 174-179.
- Villegas, E., & Gilliland, S. E. (2006). Hydrogen Peroxide Production by *Lactobacillus delbrueckii* Subsp. *Lactis* I at 5°C. *Journal of Food Science*, 63(6), 1070-1074.
- Yang, R., & Ray, B. (1994). Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 11, 281-291.
- Zeng, W.-C., Zhu, R.-X., Jia, L.-R., Gao, H., Zheng, Y., & Sun, Q. (2011). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oil from *Gnaphalium affine*. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 49(6), 1322-8.

CAPÍTULO IV

Aplicación en carne de cerdo de un bioconservante obtenido a partir de un cultivo starter de *L. plantarum*

IV. APLICACIÓN EN CARNE DE CERDO DE UN BIOCONSERVANTE OBTENIDO A PARTIR DE UN CULTIVO STARTER DE *L. PLANTARUM*

IV.1 INTRODUCCIÓN

La composición de la carne y sus características fisicoquímicas posibilitan el crecimiento de diversos microorganismos alterantes y patógenos, entre los cuales se pueden encontrar bacterias de los géneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Brochothrix*, *Flavobacterium*, *Psychrobacter*, *Moraxella*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Clostridium*, además de bacterias ácido-lácticas (BAL) y enterobacterias (Casaburi, Piombino, Nychas, Villani, & Ercolini, 2015). Para evitar el crecimiento de estos microorganismos, se pueden aplicar diferentes estrategias y métodos de conservación, tales como la congelación, la refrigeración, la ionización, las altas presiones hidrostáticas, los conservantes químicos y la bioconservación (Zhou, Xu, & Liu, 2010). Esta última técnica constituye una alternativa a la utilización de conservantes químicos, los cuales tienden a ser eliminados o sustituidos en los alimentos, dada la demanda actual de los consumidores de alimentos mínimamente procesados y sin aditivos (Lücke 2000).

Los bioconservantes pueden aplicarse en la carne mediante la adición de un cultivo protector (produciéndose los compuestos antimicrobianos *in situ*) o bien, agregando los metabolitos purificados o el caldo de fermentación crudo del microorganismo productor de sustancias antimicrobianas (Hartmann, Wilke, & Erdmann, 2011). De cualquier modo, la actividad antimicrobiana de los metabolitos depende de varios factores relacionados con la complejidad de la estructura, composición y propiedades físicas de la carne (Aasen et al., 2003; Devlieghere, Vermeiren, & Debevere, 2004; Vermeiren, Devlieghere, Vandekinderen, & Debevere, 2006).

En la bioconservación con cultivos protectores suelen utilizarse cepas de BAL productoras de bacteriocinas. Por ejemplo, Albano et al. (2007), aplicaron cepas de *P. pentosaceus* aisladas de un embutido tradicional (alheiras), demostrando actividad antimicrobiana sobre *L. innocua*, atribuyéndola en parte a la producción *in situ* de

bacteriocinas. Por su parte, Tomé, Gibbs, & Teixeira (2008) observaron resultados similares sobre *L. innocua* en salmón ahumado, utilizando como cultivos protectores *Enterococcus faecium* ET05, *Lactobacillus curvatus* ET06 y *P. acidilactici* ET34. Metaxopoulos, Mataragas, & Drosinos (2002), advirtieron que las salchichas inoculadas con *Leuconostoc mesenteroides* L124 y *L. curvatus* L442, presentaban una reducción en la concentración de microorganismos alterantes (enterococos y *Brochothrix thermosphacta*) sin modificarse las propiedades organolépticas del producto, lo cual es deseable cuando se aplican cultivos protectores. Maragkoudakis et al. (2009), utilizaron como cultivos protectores *E. faecium* PCD71 y *Lactobacillus fermentum* ACA-DC179 en carne de pollo, encontrando una reducción significativa de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*.

La desventaja en la utilización de cultivos protectores se encuentra en que en algunos casos pueden ser difíciles de aplicar o inactivarse por el calor; además, en muchos casos su efectividad no está comprobada en los alimentos (Devlieghere et al., 2004). A pesar de que son abundantes los estudios que tratan sobre el potencial de las cepas productoras de bacteriocinas como cultivos protectores en carne, pocas de ellas se comercializan. Se debe considerar que las cepas no productoras de bacteriocinas también representan una alternativa válida como cultivos protectores, ya que también proporcionan un efecto inhibitorio gracias a la producción de ácidos y a que estas cepas compiten con la flora originalmente presente en el alimento (Devlieghere et al., 2004).

Otra forma de aplicar bioconservantes es a través de la adición de bacteriocinas purificadas. La más utilizada es la nisina (Ananou et al., 2005), disponible como preparado comercial para aplicarse en alimentos desde 1957, siendo aceptada internacionalmente en 1969 por el comité de expertos en aditivos alimentarios de la FAO/WHO (Chen & Hoover, 2003). Su efecto antimicrobiano en productos cárnicos ha sido estudiado por diversos autores, demostrando efectividad cuando se aplica sola o con otros ingredientes. Por ejemplo, Nattress, Yost, & Baker (2001), aplicaron nisina y lisozima en diferentes proporciones en carne de cerdo (magro y grasa), observando un efecto inhibitorio sobre

Carnobacterium y *Brochothrix thermosphacta*. Otro caso más reciente es el reportado por Turgis et al. (2012), quienes observaron un efecto antimicrobiano sinérgico sobre *L. monocytogenes* al aplicar nisina y radiación en carne para salchichas. En otro estudio, Wijnker et al. (2011), en base a sus resultados proponen que el tratamiento con nisina de tripas naturales para embutir, podría reducir la germinación de esporas de *Clostridium*. Sin embargo, la nisina probablemente no sea la bacteriocina más adecuada para la bioconservación de la carne, al contrario de lo que ocurre con los lácteos (Abee, Krockel, & Hill, 1995), debido a que su efectividad se ve reducida a $\text{pH} > 5,0$ (Ananou et al., 2010).

En diferentes estudios se han utilizado otras bacteriocinas como bioconservantes en productos cárnicos. Por ejemplo, la enterocina AS-48, producida por *Enterococcus faecalis* S-48 ha sido aplicada en la bioconservación de salchichas de cerdo, mostrando efectividad sobre *L. monocytogenes* (Ananou et al., 2005). Jacobsen, Budde, & Koch (2003) aplicaron leucocinas provenientes de una cepa de *Leuconostoc carnosum* en salchichas cocidas, observando una reducción de los recuentos de *L. monocytogenes* durante 21 días. Aasen et al. (2003), reportaron inhibición del desarrollo de *L. monocytogenes* durante tres semanas en pollo y salmón ahumado al aplicar 3,5 $\mu\text{g/g}$ de sakacina P (Winkowski, Crandall, & Montville, 1993).

Aunque en la literatura científica se encuentran diversos estudios en los que se aplican efectivamente bacteriocinas en forma purificada, se debe considerar que su efecto antimicrobiano se limita generalmente a bacterias Gram positivas (Winkowski et al., 1993), y además pueden ser inactivadas en la carne (Hartmann et al., 2011). Por esto, en muchos casos convendría la aplicación de los caldos de fermentación crudos, debido a que en este caso se contaría con la ventaja de aplicar en un solo producto antimicrobiano las diferentes sustancias activas (incluyendo bacteriocinas), aprovechando así el posible efecto sinérgico entre ellas (Hartmann et al., 2011).

En base a estas consideraciones, en este capítulo se estudiará la aplicación de diferentes concentraciones del producto en polvo obtenido a partir del caldo de

fermentación del cultivo starter *L. plantarum*, como bioconservante para carne picada de cerdo.

IV.2 OBJETIVOS

En este capítulo se establecieron los siguientes objetivos:

- Objetivo general:
 - Determinar la efectividad como bioconservante del extracto libre de células obtenido del proceso de fermentación de *L. plantarum*, estabilizado por liofilización (L-24FR), en la carne picada de cerdo.
- Objetivos específicos:
 - Evaluar el efecto de L-24FR sobre la microbiota autóctona de la carne picada de cerdo.
 - Determinar los cambios en las propiedades fisicoquímicas producidos al incorporar L-24FR.
 - Establecer las concentraciones efectivas que podrían aplicarse a la carne picada de cerdo en función de los cambios microbiológicos y fisicoquímicos.

IV.3 MATERIALES Y MÉTODOS

IV.3.1 Plan de trabajo

El plan de trabajo seguido en el presente capítulo se muestra en la Figura IV-1. Se determinó la capacidad antimicrobiana *in vivo* del producto obtenido a través de la liofilización del caldo de fermentación de 24 h de *L. plantarum* (L-24FR). Para ello, se añadieron diferentes concentraciones del bioconservante en carne picada de cerdo y se realizaron recuentos de aerobios mesófilos, bacterias ácido-lácticas y enterobacterias. Así,

se determinó el efecto de la dosis aplicada sobre el crecimiento de dichos microorganismos durante el almacenamiento en refrigeración. Del mismo modo, se estudiaron los cambios en el pH, la pérdida de agua por goteo y las propiedades ópticas, debidos a la adición de L-24FR empleando las mismas condiciones de almacenamiento que en el análisis microbiológico.

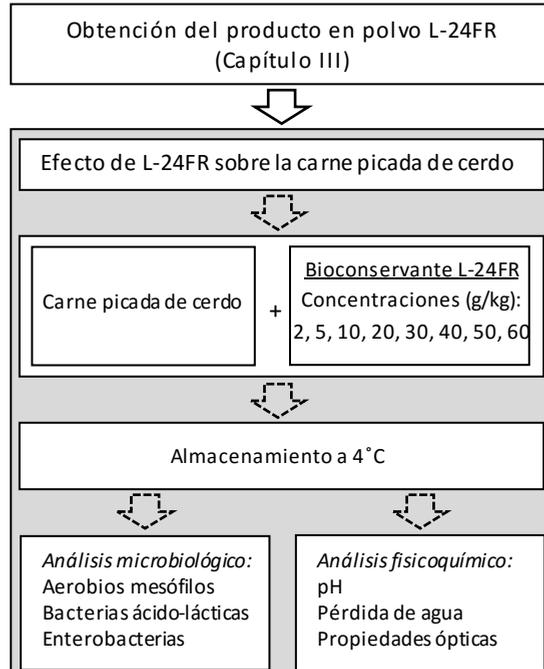


Figura IV-1. Plan de trabajo del Capítulo IV

IV.3.2 Elaboración del bioconservante L-24FR

El bioconservante L-24FR se elaboró a partir del caldo de fermentación estabilizado por liofilización de *L. plantarum*, según el procedimiento descrito en el apartado III.3.4. Explicado brevemente, para la obtención del bioconservante, se inoculó 800 mL de caldo De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (Scharlau, Barcelona, España) con un cultivo de *L. plantarum* (2%) de 24 h de fermentación, y se incubó en estufa a 37°C por 24 h. Finalizado este tiempo, el caldo producido se centrifugó (15557g, 10 min, 4°C) en una centrífuga

ependorf 5804 R (Hamburgo, Alemania) y se filtró con membranas de polietersulfona de 0,22 μm (Pall Corp., Michigan, EEUU) para obtener el extracto libre de células (CFE). Luego de adicionar dextrina (Josefa Estellés Mayor S.L., Valencia, España) al 10% (p/v) como soporte, el CFE se liofilizó en un equipo liofilizador LyoAlfa-6 (Telstar, Barcelona, España) para obtener un producto en polvo, el cual se envasó a vacío y se almacenó a -18°C hasta su uso.

IV.3.3 Preparación de las muestras

Se utilizó carne magra de cerdo (magro de cabeza) comprada en un comercio local. Se picó asépticamente en una picadora de alimentos Moulinex DP700 (Francia), se homogeneizó y se separó en porciones a las que se les añadió diferentes cantidades de L-24FR, a concentraciones de 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 g/kg. Las muestras se homogeneizaron manualmente con una espátula estéril durante 2 minutos. Paralelamente, se preparó una muestra control sin L-24FR (0 g/kg). Las muestras se almacenaron en botes estériles con tapa, a 4°C durante 8 – 9 días. El peso de todas las muestras se fijó en 80 ± 1 g (incluyendo el bioconservante).

Para cada concentración, se prepararon dos muestras para ensayos microbiológicos y tres para análisis fisicoquímicos.

IV.3.4 Análisis microbiológico

IV.3.4.1 Recuentos microbianos

Se extrajeron asépticamente 10 ± 1 g de cada muestra, que se homogeneizaron en stomacher (IUL Instruments, Barcelona, España) con agua de peptona tamponada (Scharlab, Barcelona, España). Se prepararon diluciones decimales seriadas para recuento en placa.

Los microorganismos analizados, las condiciones de incubación y los medios de cultivo empleados fueron los siguientes: aerobios mesófilos, en Plate Count Agar (Scharlau, Barcelona, España), incubando a 30°C por 48 h (UNE-EN ISO 4833-1:2013); enterobacterias, en agar VRBD (Scharlau, Barcelona, España), a 37°C por 24 h de incubación (UNE 34-557-83) y bacterias ácido-lácticas, en agar MRS (Scharlau, Barcelona, España), incubando a 30°C durante 48 h (ISO 15214:1998).

IV.3.4.2 Modelización de las curvas de crecimiento

Los valores de los recuentos se ajustaron al modelo de Baranyi & Roberts (1994) (Ec. IV-1 y Ec. IV-2), empleando DMFit web-edition de Combase (<http://www.combase.cc/>).

$$y(t) = y_0 + \mu_{\max} A(t) - \frac{1}{m} \ln \left(1 + \frac{e^{m \mu_{\max} A(t)} - 1}{e^{m(y_{\max} - y_0)}} \right) \quad \text{Ec. IV-1}$$

$$A(t) = t + \frac{\ln(e^{-\mu_{\max} t} + e^{-h_0} - e^{-vt-h_0})}{\mu_{\max}} \quad \text{Ec. IV-2}$$

Donde $y(t)$ = concentración de células (log ufc/g) a un tiempo $t(d)$, y_0 = concentración de células (log ufc/g) para $t=0$ d, μ_{\max} = velocidad máxima específica de crecimiento (1/d), m = parámetro de curvatura para caracterizar el paso desde la fase exponencial, v = parámetro de curvatura que caracteriza la transición hacia la fase exponencial, h_0 = parámetro que cuantifica el estado fisiológico inicial de las células. Para los parámetros de curvatura, se sugiere $v = \mu_{\max}$ y $m = 1$, de manera que se reduzca el número de parámetros. Así, el tiempo de latencia $\lambda(d)$ se puede calcular como $\lambda(d) = h_0/\mu_{\max}$ (Grijspeerdt & Vanrolleghem, 1999). Por otra parte, se obtuvieron los parámetros estadísticos R^2 = coeficiente de correlación y SE = Error estándar del ajuste.

IV.3.4.3 Modelización de las curvas de inactivación

En los casos en los que se presentó un comportamiento decreciente de los recuentos microbianos, el ajuste de los datos se realizó empleando los siguientes modelos:

- a. Modelo de Baranyi & Roberts (1994) modificado: se obtiene a partir de la imagen especular de la curva que proporciona el modelo de crecimiento (Ec. IV-1) (Baranyi et al., 1996). De esta forma se puede describir una curva de inactivación en base a los mismos parámetros del modelo de crecimiento.
- b. Modelo de Geeraerd, Herremans, & Van Impe (2000) :

$$y(t) = \frac{y_0 \cdot e^{-k_{\max}t} \cdot e^{k_{\max}S}}{(1 + (e^{k_{\max}S} - 1)) \cdot e^{-k_{\max}t}} \quad \text{Ec. IV-3}$$

Donde: $y(t)$ = población residual (log ufc/g) a un tiempo t (d), y_0 = población inicial (log ufc/g), k_{\max} = tasa de decrecimiento (log ufc.g⁻¹.d⁻¹), S = duración de la fase hombro (d).

- c. Modelo de Weibull (Mafart, Couvert, Gaillard, & Leguerinel, 2002):

$$\log y(t) = \log y_0 - \left(\frac{t}{\delta}\right)^p \quad \text{Ec. IV-4}$$

Donde: $y(t)$ = población residual, y_0 = población inicial, t = tiempo (d), δ = tiempo para lograr la primera reducción decimal, p = parámetro de curvatura.

- d. Modelo bifásico (Cerf, 1977):

$$\log y(t) = \log y_0 + \log(f \times e^{-k_{\max 1}t} + (1 - f) \times e^{-k_{\max 2}t}) \quad \text{Ec. IV-5}$$

Donde: $y(t)$ = población residual, y_0 = población inicial, t = tiempo (d), f = fracción de la población inicial en una subpoblación mayor (1-f) = fracción de la población inicial en una población menor, $k_{\max 1}$, $k_{\max 2}$ = tasas de inactivación específicas (1/d) de las dos poblaciones.

En el caso del modelo de Baranyi y Roberts modificado (a), se utilizó la herramienta DMFit web-edition de Combase (<http://www.combase.cc/>) para la modelización, como se

comentó en el apartado IV.3.4.2. En cuanto a los modelos b, c y d, se utilizó el complemento para Microsoft Excel GlnaFit (A. Geeraerd, Valdramidis, & Impe, 2005). En todos los casos se obtuvo el coeficiente de correlación (R^2) y el error estándar (SE).

IV.3.5 Análisis fisicoquímico

Las determinaciones fisicoquímicas (pH, pérdida de agua por goteo y propiedades ópticas) se realizaron en muestras preparadas por triplicado, almacenadas a 4 °C durante el estudio. Los análisis se efectuaron a los 0, 2, 6 y 8 d.

IV.3.5.1 pH

Se utilizó un pHmetro micropH 2001 (Crison Instruments, S.A., Barcelona, España) con un electrodo de punción Crison 5231. La medición se realizó en tres puntos de la muestra.

IV.3.5.2 Pérdida de agua por goteo

Se empleó el método gravimétrico de Honikel (1998), que consiste en colocar dentro de una red una porción de carne y mantenerla dentro en un recipiente cerrado, de modo que el agua que pierde la muestra por goteo pueda caer y depositarse en el fondo del envase. Así, la pérdida de agua por goteo se determina como:

$$\%DL = \frac{m_0 - m_t}{m_t} \times 100 \quad \text{Ec. IV-6}$$

Donde: DL = pérdida agua por goteo (%), m_t = masa de la muestra (g) para un tiempo t (d), m_0 = masa de la muestra (g) para t = 0 d.

IV.3.5.3 Propiedades ópticas

Se determinaron las coordenadas CIE-L*a*b* (CIE, 1986) y los espectros de reflectancia (%) (SCE) de las muestras por medio de un colorímetro Konica Minolta CM-700d (Minolta Corp., New Jersey, EEUU), utilizando máscara de 8 mm, iluminante D65 y

observador 10°. Se realizaron 10 medidas de la superficie de las muestras, previamente extendidas uniformemente en un recipiente plano hasta alcanzar 2 cm de espesor. A partir de dichas medidas se calculó la diferencia de color (Ec. IV-7) y el cociente de la reflectancias a 630 y 580 nm (Ec. IV-8).

$$\Delta E = [(L^* - L_o^*)^2 + (a^* - a_o^*)^2 + (b^* - b_o^*)^2]^{1/2} \quad \text{Ec. IV-7}$$

$$R_{630/580} = \frac{\% \text{Reflectancia } 630 \text{ nm}}{\% \text{Reflectancia } 580 \text{ nm}} \quad \text{Ec. IV-8}$$

IV.3.6 Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos se realizó con Statgraphics Centurion XV versión 15.2.06 (Manugistics Corp., Rockville, Md.), utilizando un nivel de confianza de 95%. Se efectuaron ANOVAs para evaluar la significación de los factores y sus interacciones. Cuando estos resultaron significativos se analizaron las diferencias entre los distintos niveles mediante la prueba de múltiple rangos, utilizando el test de Tukey (HSD) para discriminar entre las medias.

IV.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.4.1 Efecto de L-24FR sobre la microbiota de la carne picada de cerdo

Los ensayos de capacidad antimicrobiana de L-24FR se realizaron por etapas, comenzando por las concentraciones más altas, de 40, 40 y 60 g/kg. Al comprobar la actividad antimicrobiana a estas concentraciones, se testaron dosis de 20 y 30 g/kg. Como se observó que aún se conseguía un efecto antimicrobiano, en una tercera etapa se utilizaron dosis de 2,5 y 10 g/kg, con la finalidad de conocer las concentraciones mínimas capaces de inhibir el desarrollo de los microorganismos presentes en la carne.

El efecto observado de L-24FR sobre aerobios mesófilos, se muestra en la Figura IV-2. En el caso de la muestra control se produjo un aumento constante de los recuentos hasta el quinto día de almacenamiento, y una notable diferencia con respecto a las muestras con 40, 50 y 60 g/kg de bioconservante (Figura IV-2a). Así, observó una notable reducción de y_f , de 1,2 – 1,6 log ufc/g al final del almacenamiento, mientras que y_0 disminuyó aproximadamente una unidad logarítmica (Tabla IV-1). Dada la superposición de las curvas de 40, 50 y 60 g/kg, se entiende que estas dosis de L-24FR, son iguales en cuanto a la capacidad inhibitoria sobre aerobios mesófilos.

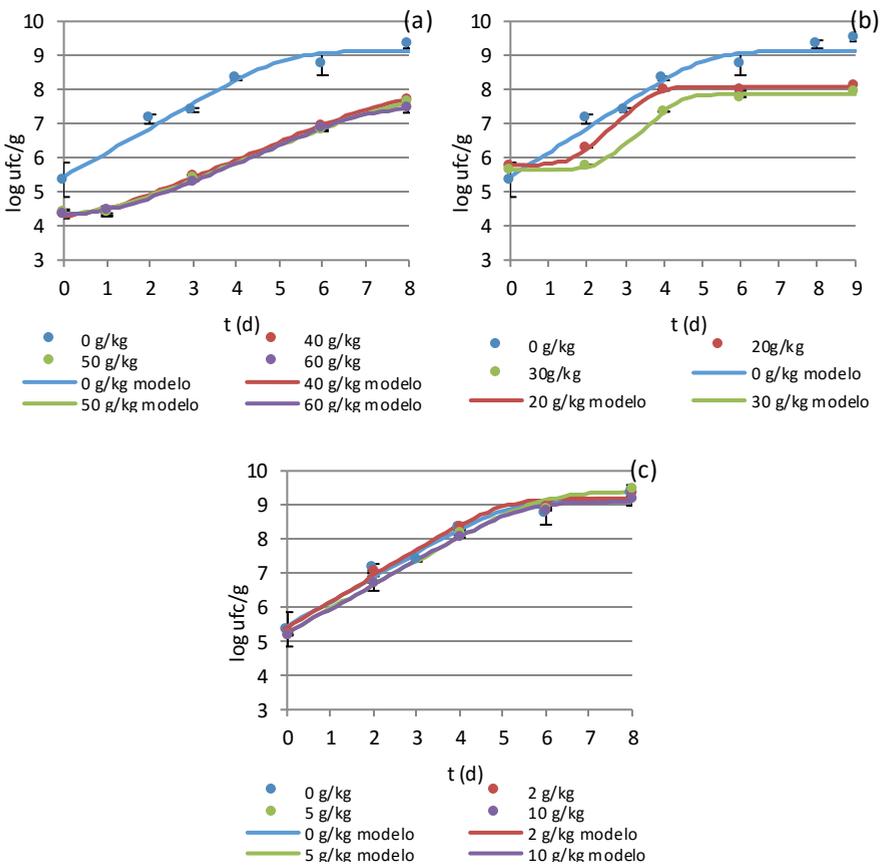


Figura IV-2. Efecto de diferentes concentraciones (g/kg) de L-24FR sobre aerobios mesófilos en carne picada de cerdo

Tabla IV-1. Parámetros del modelo de crecimiento (Baranyi & Roberts, 1994) de aerobios mesófilos en carne picada de cerdo con diferentes concentraciones de L-24FR

Conc. (g/kg)	y_0 (log ufc·g ⁻¹)	y_f (log ufc·g ⁻¹)	λ (d)	μ_{max} (log ufc·g ⁻¹ ·d ⁻¹)	SE	R ²
0	5,44 ± 0,20	9,13 ± 0,17	-	0,72 ± 0,08	0,364	0,943
2	5,39 ± 0,12	9,19 ± 0,10	-	0,77 ± 0,05	0,985	0,190
5	5,26 ± 0,17	9,40 ± 0,19	-	0,70 ± 0,06	0,974	0,268
10	5,23 ± 0,09	9,11 ± 0,08	-	0,71 ± 0,04	0,992	0,136
20	5,79 ± 0,08	8,08 ± 0,06	1,6 ± 0,2	1,00 ± 0,14	0,112	0,989
30	5,65 ± 0,10	7,87 ± 0,07	2,3 ± 0,4	0,99 ± 0,22	0,134	0,984
40	4,28 ± 0,07	7,86 ± 0,16	0,9 ± 0,3	0,53 ± 0,03	0,101	0,995
50	4,34 ± 0,07	7,82 ± 0,21	1,1 ± 0,3	0,52 ± 0,04	0,110	0,994
60	4,32 ± 0,05	7,53 ± 0,09	1,2 ± 0,2	0,54 ± 0,03	0,084	0,996

El efecto antimicrobiano observado puede deberse, como se comentó en el capítulo anterior, a la presencia de ácido láctico. El lactato, puede pasar a través de la membrana en su forma no disociada y al ingresar en la célula, se disocia reduciendo el pH interno y la actividad de agua (Lemay et al., 2002).

A continuación, dado el poder antimicrobiano observado, se utilizaron concentraciones de 20 y 30 g/kg (Figura IV-2b), obteniéndose en este caso, como era de esperarse, una reducción menos marcada de y_f (~1 log ufc/g a los 8 días de almacenamiento), sin diferencias en y_0 con respecto a la muestra control (Tabla IV-1).

Por último, al utilizar concentraciones de 2, 5 y 10 g/kg, el efecto antimicrobiano se redujo notablemente, obteniéndose una y_f de la misma magnitud que en la muestra control (Tabla IV-1). A diferencia de lo observado con las concentraciones mayores, las curvas de crecimiento no presentaron fase de latencia, debido a que en este caso la concentración de ácido y el pH no ejercerían un efecto antimicrobiano sobre aerobios mesófilos. Estos resultados son similares a los de Allen, Russell, y Fletcher (1997), quienes observaron una disminución de la fase de latencia de los microorganismos psicrotrofos, al aumentar el pH de la carne.

El efecto antimicrobiano de L-24FR aún a concentraciones bajas podría tener aplicaciones interesantes si se combinara con otras técnicas de conservación, lo que se conoce comúnmente como tecnología de los obstáculos o “Hurdle technologies” (Hartmann et al., 2011). Así, la aplicación de técnicas de conservación simultáneas como el envasado en atmósfera modificada, o la adición de otros ingredientes antimicrobianos (sal y/o especias) podrían servir como estrategia para la extensión de la vida útil del producto.

Las curvas de crecimiento de las enterobacterias en las muestras con L-24FR mostraron en general un comportamiento diferenciado en comparación con la de la muestra Control, como puede observarse en la Figura IV-3. Cuando se utilizaron concentraciones de 40, 50 y 60 g/kg (Figura IV-3a), se produjo una disminución progresiva de los recuentos en el transcurso del tiempo (velocidad de crecimiento negativa, como se indica en la Tabla IV-2). Así, para $t = 8$ d se obtuvo una reducción de 5,5 y 5,8 unidades logarítmicas para 40 y 50 g/kg con respecto a la muestra control, y de 6,5 unidades logarítmicas en el caso de 60 g/kg, demostrándose de esta forma el importante efecto antimicrobiano de L-24FR sobre las enterobacterias.

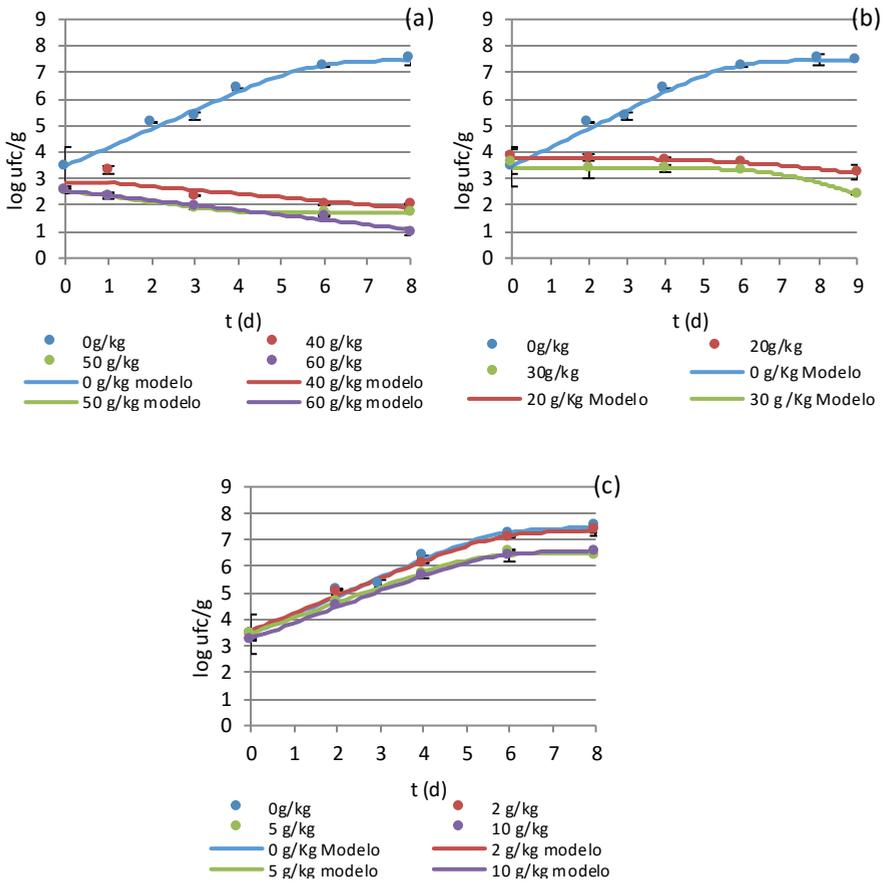


Figura IV-3. Crecimiento de enterobacterias en carne picada de cerdo tratada con diferentes concentraciones de L-24FR

Al reducir las concentraciones a 20 y 30 g/kg (Figura IV-3b), se produjo una fase hombro de unos 7 días, y una fase exponencial de inactivación a partir de dicho valor de tiempo, dado que produce una velocidad de crecimiento decreciente. Por otra parte, a concentraciones de 2, 5 y 10 g/kg (Figura IV-3c), aún se mantiene el efecto antimicrobiano de L-24FR aunque se reduce drásticamente, al alcanzarse una disminución de γ_f de 0,9 log ufc/g con 5 y 10 g/kg, siendo inefectiva la dosis de 2 g/kg.

Tabla IV-2. Parámetros de los modelos de crecimiento e inactivación de enterobacterias en carne picada de cerdo con diferentes concentraciones de L-24FR

Conc. (g/kg)	Y_0 (log ufc·g ⁻¹)	Y_f (log ufc·g ⁻¹)	S (d)	μ_{max}/K_{max} (log ufc·g ⁻¹ ·d ⁻¹)	SE	R ²
0*	3,47 ± 0,22	7,46 ± 0,22	-	0,70 ± 0,09	0,393	0,950
2*	3,57 ± 0,12	7,35 ± 0,13	-	0,66 ± 0,05	0,194	0,984
5*	3,47 ± 0,19	6,50 ± 0,16	-	0,58 ± 0,08	0,288	0,947
10*	3,27 ± 0,20	6,56 ± 0,19	-	0,60 ± 0,08	0,310	0,947
20**	3,79 ± 0,09	-	7,0 ± 1,5	0,54 ± 0,32	0,1705	0,701
30***	3,40 ± 0,11	-	7,2 ± 1,3	1,21 ± 0,82	0,2464	0,782
40****	2,84 ± 0,17	-0,14 ± 0,07	1,0 ± 2,8	-0,139 ± 0,067	0,336	0,567
50*	2,55 ± 0,13	1,72 ± 0,11	-	-0,214 ± 0,077	0,217	0,711
60*	2,55 ± 0,06	-	-	-0,183 ± 0,012	0,115	0,962

Modelos: *Baranyi y Roberts, 1994**Geeraerd et al. 2000. ***Mafart et al. 2002: Weibull. ****Bifásico

Aunque las enterobacterias sean conocidas por su capacidad de adaptarse a condiciones ácidas moderadas (pH = 5) (Signorini, Ponce-Alquicira, & Guerrero-Legarreta, 2006), es difícil hacer generalizaciones sobre su comportamiento, como apuntan Gill & Newton (1982), ya que incluye un gran número de especies. En su estudio, estos autores observaron una inhibición del 20% de las cepas de enterobacterias inoculadas en agar nutritivo con ácido láctico (pH 5,5) (T=2°C). Destacan además, el importante efecto de la temperatura sobre el crecimiento de estos microorganismos, siendo parcialmente inhibidos a temperaturas de refrigeración, a diferencia de otros microorganismos psicrófilos como las pseudomonas. De cualquier modo, como ocurre con otros grupos microbianos, las diferentes cepas que componen las enterobacterias pueden desarrollarse a temperaturas diferentes, siendo algunas de ellas capaces de crecer en refrigeración (Borch, Kant-Muermans, & Blixt, 1996), lo cual representa una ventaja competitiva frente a otros microorganismos en la carne almacenada en frío.

Desde el punto de vista de la bioconservación de la carne, es interesante el efecto antimicrobiano observado sobre las enterobacterias, debido a que agrupan géneros de microorganismos patógenos como *Salmonella* y algunos microorganismos alterantes, entre los que destacan *Hafnia alvei* y *Serratia liquefaciens*, los cuales producen aminas y

decoloración en la carne (Doulgeraki, Paramithiotis, & Nychas, 2011). Las enterobacterias estarían implicadas además en la producción de olores propios de la alteración de la carne, como la acetoina, diacetilo y 3-metil-butanol (Borch et al., 1996).

En el caso de las bacterias ácido-lácticas (BAL) (Figura IV-4), se observó una importante fase de latencia cuando se utilizaron 40 g/kg (Figura IV-4a), demostrando dificultades de adaptación de estos microorganismos a las condiciones ácidas del medio debido a la incorporación de L-24FR. Mantener el pH en un valor bajo puede afectar el crecimiento de las BAL, debido al daño celular y pérdida de la viabilidad que se produce (Hutkins & Nannen, 1993). Este efecto fue más importante al utilizar concentraciones de 50 o 60 g/kg, ya que se observó un descenso marcado de los recuentos, aunque a partir del sexto día de almacenamiento se produjo una recuperación de los mismos. Signorini et al. (2006) observaron también una reducción de los recuentos de BAL en carne tratada con ácido láctico (200 mg/100 g), encontrando una reducción de una unidad logarítmica en comparación con la muestra control durante los primeros 4 días a 4°C. La recuperación de los recuentos a partir del sexto día de almacenamiento puede deberse a la habilidad de las BAL de adaptarse a condiciones ácidas regulando el pH intracelular (Hutkins & Nannen, 1993; Serrazanetti, Guerzoni, Corsetti, & Vogel, 2009), de manera que podrían crecer en la carne tratada con L-24FR.

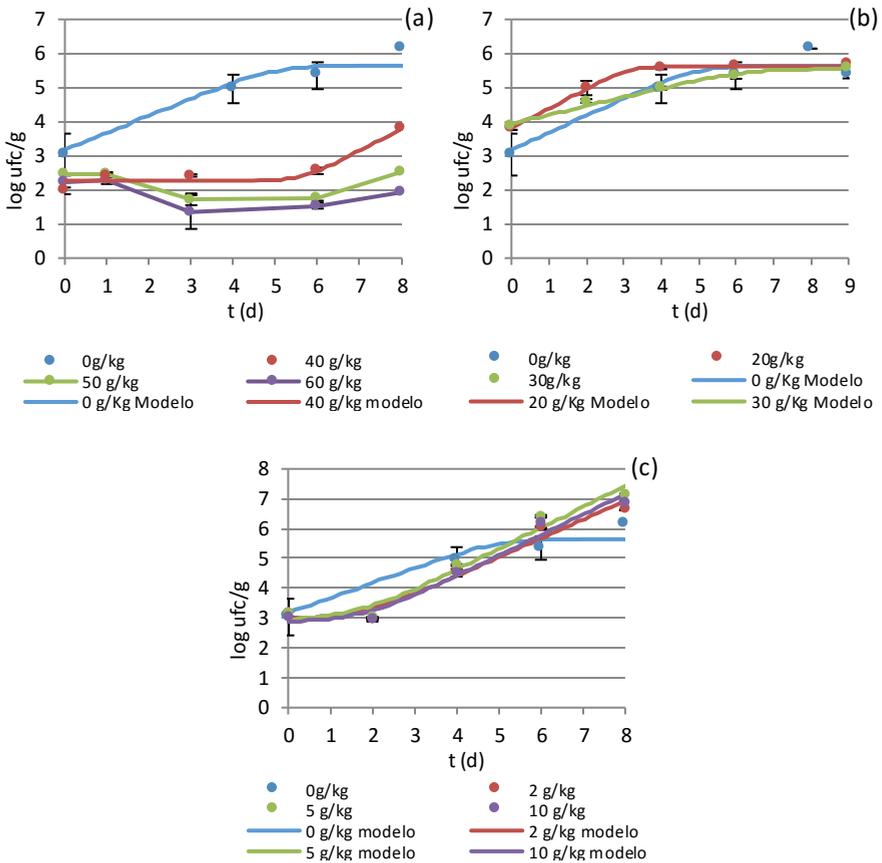


Figura IV-4. Crecimiento de bacterias ácido-lácticas en carne picada de cerdo tratada con diferentes concentraciones de L-24FR

Al disminuir la concentración de bioconservante a concentraciones entre 2 y 30 g/kg (Figura IV-4b y Figura IV-4c), se produjo un crecimiento de las BAL a niveles similares o superiores al encontrado en la muestra control. Esto puede deberse a que los grupos microbianos que dominan en la carne dependerían de la presencia de L-24FR. Así, tomando en cuenta que la muestra control no se encuentra acidificada (ausencia de L-24FR), en ella se produciría el crecimiento de grupos microbianos entre los que se encontrarían aquellos que podrían estar afectados por la presencia de ácido y por la disminución del pH, mientras que en las muestras con L-24FR, se favorecería el crecimiento de microorganismos capaces de crecer en un entorno acidificado, como las

BAL. En consecuencia, en el caso de las muestra control crecerían diferentes grupos microbianos que podrían ejercer un efecto antagónico sobre las BAL, limitando su crecimiento, lo cual explicaría que los recuentos de BAL en la muestra control en la Figura IV-4c sean inferiores a los de las muestras con bioconservante. En cambio, la presencia de L-24FR a las concentraciones de 2, 5 y 10 g/kg favorecería que las BAL se convirtiesen en la flora dominante, pudiendo crecer entonces a niveles superiores a los encontrados en la carne sin bioconservante. La capacidad de estos microorganismos de convertirse en la flora dominante, puede atribuirse en muchos casos al efecto antagonista que producen sobre otros microorganismos, afectando su desarrollo debido a la competencia por nutrientes o a la producción de sustancias con actividad antimicrobiana (Cálix-Lara et al., 2014; O’Sullivan, Ross, & Hill, 2002). Adicionalmente, algunas BAL son psicrotroficas, siendo entonces capaces de crecer a temperatura de refrigeración (Calo-Mata et al., 2007), mientras que otros microorganismos alterantes como las enterobacterias o *Brochothrix thermosphacta*, se inhiben a temperaturas bajas.

Tabla IV-3. Parámetros del modelo de crecimiento de Baranyi & Roberts (1994) bacterias ácido-lácticas (BAL) en carne picada de cerdo con diferentes concentraciones de L-24FR

Conc. (g/kg)	Y_0 (log ufc·g ⁻¹)	Y_f (log ufc·g ⁻¹)	λ (d)	μ_{max}/K_{max} (log ufc·g ⁻¹ ·d ⁻¹)	SE	R ²
0	3,18± 0,32	5,64± 0,25	-	0,50± 0,14	0,571	0,769
2	2,98± 0,28	-	1,8± 0,8	0,64± 0,09	0,411	0,932
5	2,97 ± 0,26	-	1,7 ± 0,7	0,71 ± 0,08	0,382	0,953
10	2,88 ± 0,24	-	1,8 ± 0,7	0,69 ± 0,07	0,350	0,957
20	3,82± 0,07	5,63± 0,04	-	0,57± 0,05	0,093	0,984
30	3,94± 0,07	5,55± 0,08	-	0,26± 0,03	0,119	0,966
40	2,27± 0,08	-	5,7± 0,4	0,66± 0,12	0,202	0,904
50	No converge*					
60	No converge*					

*Los datos no se ajustan al comportamiento clásico. Los puntos no convergen a ningún modelo utilizado.

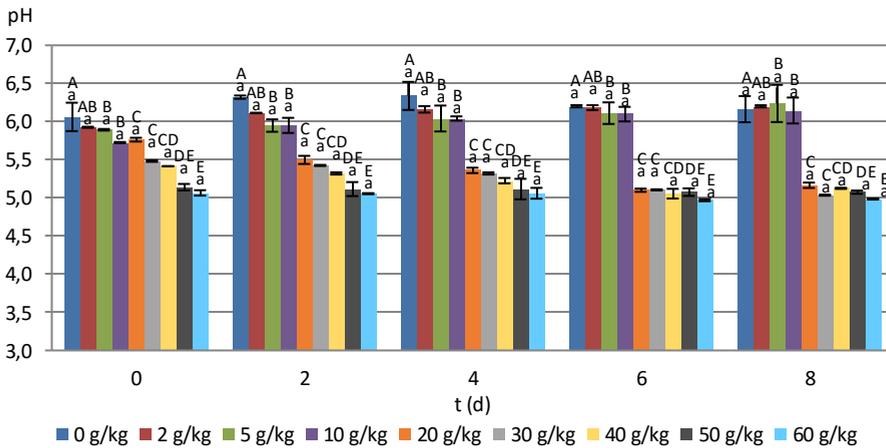
Aunque la proliferación de las BAL en el alimento no perjudicaría la seguridad del mismo, podría comprometer su calidad organoléptica debido a la producción de sustancias sensorialmente indeseables, como ácido acético, diacetilo, acetoína y sulfuro

de hidrógeno entre otros. La aparición de estas sustancias suele ocurrir en condiciones de baja concentración de glucosa (como ocurre en los productos cárnicos) en las que predomina el metabolismo heterofermentativo (Borch et al., 1996; Casaburi et al., 2015).

IV.4.2 Efecto de L-24FR sobre las propiedades fisicoquímicas de carne picada de cerdo

IV.4.2.1 Efecto sobre el pH

En la Figura IV-5 se muestra el efecto de la concentración de L-24FR sobre el pH durante 8 días de almacenamiento. En la muestra control y en las muestras con 2 - 20 g/kg de L-24FR, los valores iniciales de pH se situaron dentro del rango normal del pH de la carne, entre 5,6 y 6,2 (Prandl & Escobar, 1994). Para concentraciones superiores se obtuvo una disminución de su valor, ubicándose fuera de dicho rango.



*Letra diferente indica diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test de Tukey en el ANOVA multifactorial. Mayúscula: factor Concentración. Minúscula: factor tiempo.

Figura IV-5. Cambios en el pH durante el almacenamiento de carne picada de cerdo tratada con L-24FR

La concentración de bioconservante mostró un efecto significativo ($p < 0,001$, $F = 177,67$), aunque no se encontraron diferencias ($p > 0,05$) entre la muestra control y

aquellas con 2 y 5 g/kg. Esto podría deberse a que la capacidad amortiguadora del pH de la carne (Carroll, Alvarado, Brashears, Thompson, & Boyce, 2007) sólo es efectiva a éstas concentraciones. Por otra parte, el tiempo no tuvo un efecto significativo ($p=0,0907$, $F=2,14$), mientras que la interacción entre los dos factores fue significativa ($p<0,001$, $F=3,61$).

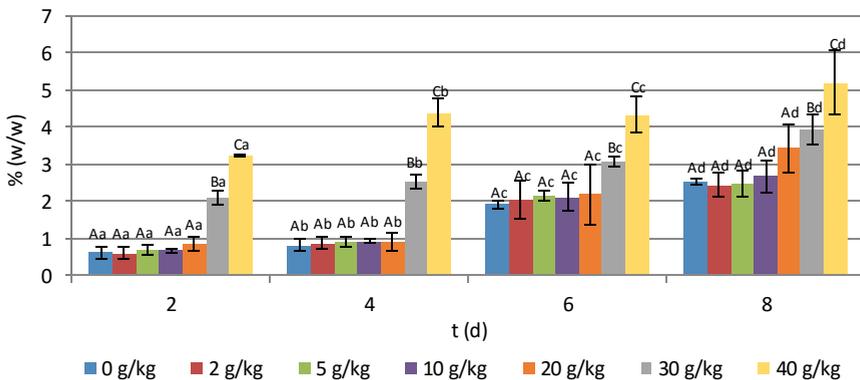
La carne con 20, 30 y 40 g/kg de L-24FR mostró una disminución continua del pH desde el inicio hasta el sexto día, sin diferencias significativas entre las tres concentraciones ($p>0,05$). Esto puede deberse a que la difusión del bioconservante, y por tanto del ácido en la carne, se produjo de forma gradual. En el caso de las concentraciones de 50 y 60 g/kg, no se obtuvieron diferencias significativas entre estos tratamientos ($p>0,05$). Aplicando estas dosis, el pH se mantuvo en su valor más bajo ($pH 5,09\pm 0,1$) desde el día 0, posiblemente debido a que la concentración de ácido fue muy elevada, venciendo el efecto amortiguador de pH de la carne de forma inmediata.

Los cambios en el pH de la carne al incorporar L-24FR se corresponden con los resultados de actividad antimicrobiana discutidos en la sección IV.4.1, debido a que, en general, se obtuvieron recuentos inferiores y valores menores de pH al aumentar la concentración de bioconservante.

IV.4.2.2 Pérdida de agua por goteo

En la Figura IV-6 se observa que a medida que aumentó la concentración de L-24FR se produjo un aumento significativo ($p<0,001$, $F = 71,54$) en la pérdida de agua por goteo, posiblemente debido al descenso del pH que se obtiene al aumentar la dosis del bioconservante (Figura IV-5). Asimismo, el tiempo influyó de forma significativa ($p<0,001$, $F=89,82$), lo cual es de esperarse debido a que la pérdida de agua por goteo es un fenómeno físico que depende del tiempo que tarda el agua en salir de la muestra de carne y caer por efecto de la gravedad. No se obtuvo interacción significativa entre los factores concentración y tiempo ($p=0,3914$, $F=1,11$).

La capacidad de retención de agua de la carne disminuye a medida que desciende el valor de pH, hasta llegar a un valor mínimo de ~5,0, que corresponde al punto isoeléctrico de la actomiosina (Brewer, 2010). Dado que el pH de la carne con 50 y 60 g/kg de L-24FR alcanzó un pH de 5,09±0,1, estas dosis no fueron utilizadas en el ensayo de pérdida de agua, puesto que se esperaban pérdidas de agua muy superiores al resto de concentraciones utilizadas en el estudio. Ya en el caso de la carne con 30 y 40 g/kg, se alcanzaron valores de pH cercanos al punto isoeléctrico de la miosina (pH = 5,3) (Brewer, 2010) durante todo el almacenamiento (Figura IV-5), de modo que la capacidad de retención de agua estaría próxima a su valor mínimo (Cheng & Sun, 2008). Por ello, en dichas muestras se obtuvo un aumento significativo ($p < 0,05$) de la pérdida de agua en comparación con la muestra control. Sólo las concentraciones bajas (2, 5 y 10 g/kg) permitirían mantener la capacidad de retención de agua del producto, ya que en estos casos no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el %DL con respecto a la muestra control.

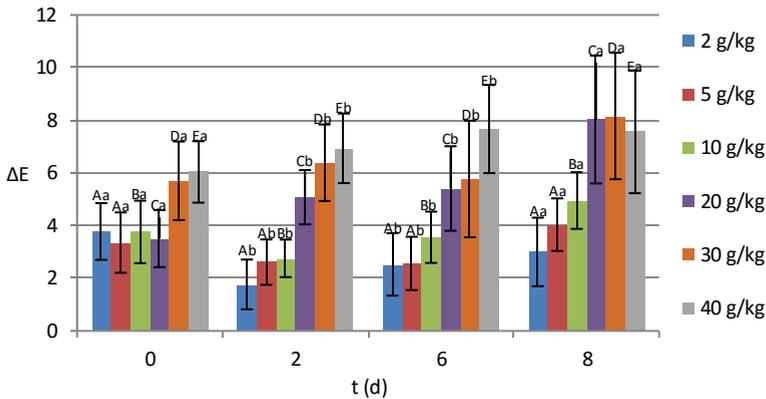


*Letra diferente indica diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test de Tukey en el ANOVA multifactorial. Mayúscula: factor Concentración. Minúscula: factor tiempo.

Figura IV-6. Pérdida de agua por goteo (%) de la carne picada de cerdo con diferentes concentraciones de L-24FR

IV.4.2.3 Propiedades ópticas

La diferencia de color con respecto a la muestra control (ΔE) presentó un comportamiento dependiente de la concentración de L-24FR ($p < 0,05$, $F = 260,49$) (Figura IV-7), observándose valores mayores a medida que aumentó la concentración.



*Letra diferente indica diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test de Tukey en el ANOVA multifactorial. Mayúscula: factor Concentración. Minúscula: factor tiempo.

Figura IV-7. Diferencias de color ($\Delta E \pm SE$) con respecto a la muestra control (0g/kg) de carne picada de cerdo tratada con L-24FR durante el almacenamiento

Los cambios en el color de la carne podrían deberse a que el producto antimicrobiano en polvo adquiere el color pardo del caldo de fermentación del cual proviene, una vez que se ha hidratado con el agua presente en la superficie de la carne. Adicionalmente, la modificación del color puede atribuirse a la formación de metamioglobina como consecuencia de la disminución del pH, lo cual es especialmente importante para valores inferiores a 6,0 (Shikama & Sugawara, 1978), lo cual ocurre a concentraciones entre 20 y 60 g/kg del bioconservante (Figura IV-5). Por otra parte, el pardeamiento de la carne puede producirse a partir de la formación de aldehídos (oxidación de lípidos), los cuales producen cambios conformacionales en la mioglobina que favorecen su oxidación (American Meat Science Association, 2012).

El incremento de ΔE en el almacenamiento ($p < 0,001$, $F = 23,72$) puede deberse a que el bioconservante se difundiría progresivamente en el producto cárnico durante el tiempo, de manera que los cambios en el color comentados anteriormente se producirían de forma gradual. Estos cambios son dependientes de la concentración utilizada, observándose que con 20, 30 y 40 g/kg, la velocidad de cambio de ΔE fue mayor a medida que transcurrió el tiempo de almacenamiento. Así, se obtuvo una interacción significativa entre los factores tiempo y concentración ($p = 0,0314$, $F = 1,84$).

Dada la heterogeneidad de la muestra, el color medido (como coordenadas $L^*a^*b^*$) comprende los diferentes componentes de la carne, como son las fibras musculares, grasa y tejido conectivo. Por ello, los valores de $L^*a^*b^*$ no proporcionan información suficiente sobre los cambios que se producen individualmente en los diferentes componentes de la carne. Una alternativa para determinar la variación del color de forma cualitativa es a través de los espectros de reflectancia.

En la Figura IV-8 se observan los cambios de los espectros de la muestra control durante el almacenamiento (a) y en las muestras con bioconservante a los 8 días (b). En el caso de la muestra Control, se obtuvo una evolución importante a partir de los 6 días, con un aumento de la reflectancia entre los $\sim 470 - 520$ nm y los $\sim 610 - 720$ nm, correspondiente a los tonos azules y verdes en el primer caso, y en el segundo, a la región de los amarillos ($\sim 580 - 600$ nm), naranjas ($\sim 600 - 650$ nm) y rojos ($\sim 650 - 740$ nm). Esto indica que la carne, en el transcurso del tiempo adquiere un color más verde pero a la vez más naranja y rojo, lo cual puede relacionarse con la formación de metamioglobina (color pardo). Por otro lado, en las muestras con bioconservante (Figura IV-8b) se obtuvo un incremento mucho mayor de las reflectancias a partir de los ~ 520 nm cuando aumentó la concentración de L-24FR, lo que le implicaría tonos más amarillos y rojos, probablemente debido al color de L-24FR.

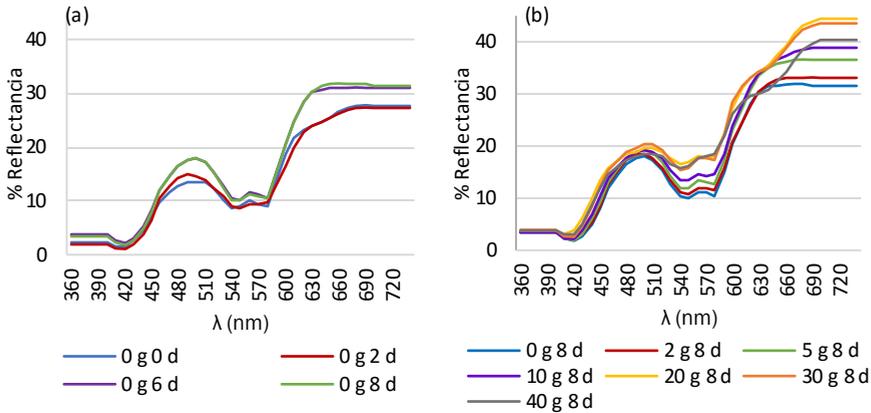
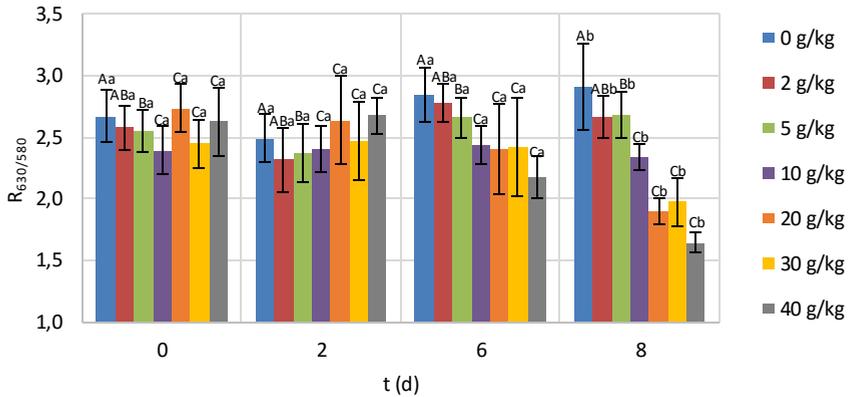


Figura IV-8. Cambios en los espectros de reflectancia en la región del visible en la carne de cerdo: (a) sin L-24FR (0g) durante el almacenamiento, y (b) para diferentes concentraciones de L-24FR a los 8 días de almacenamiento

Los cambios en los pigmentos de la carne pueden expresarse de forma cuantitativa en función del cociente de las reflectancias a 630 y 580 nm ($R_{630/580}$), que representa una manera de expresar el grado de “rojez” de la carne, de modo que está relacionado con las concentraciones de OMb, DMb y MMb (American Meat Science Association, 2012). Un valor de 1,0 representaría 100% MMb, mientras que valores más altos indicarían mayor concentración de OMb o DMb (no es específico de la OMb debido a que la DMb es más roja que la MMb a 630 nm) (American Meat Science Association, 2012).

En la Figura IV-9 se observa los cambios de $R_{630/580}$ en el tiempo según la concentración de bioconservante utilizada. El análisis estadístico de los datos indicó un efecto significativo del tiempo ($p < 0,001$, $F = 19,40$), aunque para $t = 0$ y 2 d, la carne mantiene aproximadamente el mismo valor de $R_{630/580}$ para todas las concentraciones ensayadas. A partir del sexto día de almacenamiento comienza a producirse un descenso significativo a concentraciones de 20, 30 y 40 g/kg de bioconservante con respecto a la muestra control. Estas diferencias se agudizan en el octavo día. Esto indica, como se ha comentado anteriormente, una disminución de la reflectancia en la longitud de onda correspondiente al color rojo y/o un aumento en las longitudes de onda a 580 nm, lo cual indicaría un tono más amarillo. La concentración de bioconservante también mostró un efecto significativo

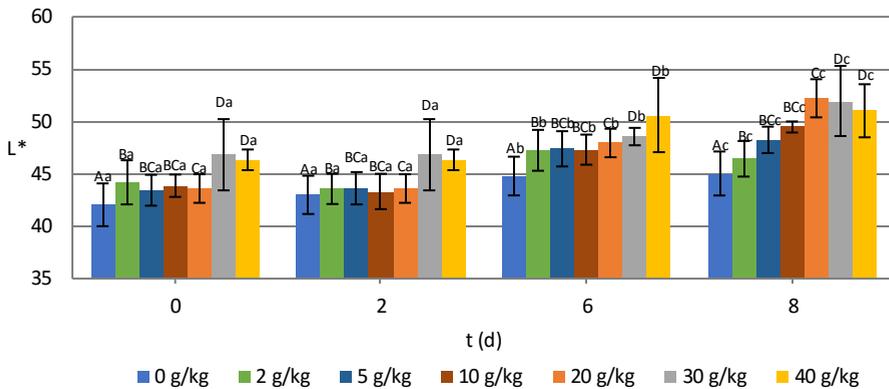
($p < 0,001$, $F = 20,36$) así como la interacción entre los factores ($p < 0,001$, $F = 13,21$), de modo similar a lo observado con ΔE . Debe tomarse en cuenta, como se mencionó anteriormente, que los cambios de color y por tanto de $R_{630/580}$, pueden deberse en gran medida no sólo a los cambios en los mioglobina debido a la oxidación, sino también a la coloración que adquiere la carne debido a la incorporación del L-24FR.



*Letra diferente indica diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test de Tukey en el ANOVA multifactorial. Mayúscula: factor Concentración. Minúscula: factor tiempo.

Figura IV-9. Cociente de las reflectancias a 630 y 580 nm ($R_{630/580}$) durante el almacenamiento de la carne de cerdo tratada con L-24FR a diferentes concentraciones

Los atributos a^* y b^* suelen estar relacionados con el estado de la mioglobina, mientras que la luminosidad (L^*) se asocia a las características estructurales del músculo, específicamente a la capacidad de la carne de dispersar la luz incidente (Hughes, Oiseth, Purslow, & Warner, 2014). En las muestras analizadas, el valor de L^* aumentó con la concentración de bioconservante ($p < 0,001$, $F = 115,84$) y el tiempo de almacenamiento ($p < 0,001$, $F = 38,75$), como se indica en la Figura IV-10, con interacción significativa entre estos factores ($p < 0,001$, $F = 3,67$), observándose que los cambios más importantes se comienzan a producir a partir del sexto día, y se acentúan al octavo día, de forma similar a lo ocurrido con $R_{630/580}$.



*Letra diferente indica diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test de Tukey en el ANOVA multifactorial. Mayúscula: factor Concentración. Minúscula: factor tiempo.

Figura IV-10. Cambios en la luminosidad (L^*) durante el almacenamiento de la carne de cerdo tratada con diferentes dosis de L-24FR

Es destacable que desde el día 0, la luminosidad de las muestras con 30 y 40 g/kg es significativamente superior ($p < 0,001$) a la de la muestra control, a diferencia de lo observado con las otras concentraciones. Este aumento de la luminosidad indicaría que la carne posee una estructura más relajada y abierta (mayor dispersión de la luz), lo cual produce una tonalidad más pálida y una menor capacidad de retención de agua (Hughes et al., 2014). Estos cambios en las propiedades de la carne son dependientes del pH, y han sido observados en carnes PSE (Pale Soft Exudative) (Leach, Ellis, Sutton, McKeith, & Wilson, 1996). En el presente estudio, la disminución del pH al incorporar el bioconservante (Figura IV-5) produjo características propias de este tipo de carne, debido a que los cambios en el pH estuvieron acompañados de mayor palidez (aumento de L^*) y un incremento de la exudación de agua, como se comentó en el apartado IV.4.2.2, lo cual produciría un aumento de la luminosidad.

IV.5 CONCLUSIONES

El producto L-24FR puede ser utilizado como bioconservante en carne de cerdo, dadas sus propiedades antimicrobianas, que han quedado demostradas con la reducción de los

recuentos de los microorganismos autóctonos presentes en la carne de cerdo. Este efecto, dependiente de la concentración, es especialmente evidente sobre las enterobacterias y en menor grado sobre los aerobios mesófilos. En el caso de las BAL, estas solo se verían inhibidas a concentraciones altas de L-24FR, dada su capacidad de crecer en entornos ácidos.

Al aumentar las concentraciones de L-24FR, la disminución del pH afecta la capacidad de retención de agua, incrementándose la pérdida de agua por goteo. Los cambios observados en la luminosidad reflejarían los cambios estructurales en la carne que producen el aumento en la pérdida de agua. La aplicación de las concentraciones más altas de L-24FR (20, 30 y 40 g/kg) implica cambios importantes en la diferencia de color (ΔE), mayormente atribuidos al color del producto bioconservante.

Cuando se utilizan concentraciones entre 2 y 10 g/kg, no se observan cambios importantes en el pH, así como en la capacidad de retención de agua de la carne. Asimismo, los cambios en las propiedades ópticas son menos evidentes. Aunque el efecto antimicrobiano a estas concentraciones es limitado, la utilización de L-24FR en conjunto con otras técnicas de conservación, como el envasado en atmósfera modificada, podría mejorar la capacidad inhibitoria conseguida. Además, el uso de otros ingredientes usualmente utilizados en productos cárnicos, como la sal y las especias, podrían producir un efecto sinérgico con L-24FR. Considerando estos aspectos, se deberán establecer las dosis óptimas que permitan extender la vida útil del producto cárnico y evaluar la aceptación organoléptica de L-24FR incorporado a dichas concentraciones.

IV.6 REFERENCIAS

- Aasen, I. M., Markussen, S., Møretrø, T., Katla, T., Axelsson, L., & Naterstad, K. (2003). Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *International Journal of Food Microbiology*, 87(1-2), 35-43.
- Abee, T., Krockel, L., & Hill, C. (1995). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International journal of food microbiology*, 28(2), 169-85.
- Albano, H., Oliveira, M., Aroso, R., Cubero, N., Hogg, T., & Teixeira, P. (2007). Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from «Alheiras» (traditional Portuguese fermented sausages): In situ assays. *Meat science*, 76(4), 796-800.
- Allen, C. D., Russell, S. M., & Fletcher, D. L. (1997). The relationship of broiler breast meat color and pH to shelf-life and odor development. *Poultry science*, 76(1993), 1042-1046.
- American Meat Science Association. (2012). *Meat Color Measurement Guidelines*.
- Ananou, S., Garriga, M., Hugas, M., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., & Valdivia, E. (2005). Control of *Listeria monocytogenes* in model sausages by enterocin AS-48. *International journal of food microbiology*, 103(2), 179-90.
- Ananou, S., Muñoz, A., Martínez-Bueno, M., González-Tello, P., Gálvez, A., Maqueda, M., & Valdivia, E. (2010). Evaluation of an enterocin AS-48 enriched bioactive powder obtained by spray drying. *Food microbiology*, 27(1), 58-63.
- Baranyi, J., Jones, A., Walker, C., Kaloti, A., Robinson, T. P., & Mackey, B. M. (1996). A Combined Model for Growth and Subsequent Thermal Inactivation of *Brochothrix thermosphacta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(3), 1029-1035.
- Baranyi, J., & Roberts, T. (1994). A dynamic approach to predict bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277-294.
- Borch, E., Kant-Muermans, M., & Blixt, Y. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat

products. *International journal of food microbiology*, 33, 103-120.

Brewer, S. (2010). Technological quality of meat for processing. En F. Toldrá (Ed.), *Handbook of Meat Processing* (pp. 25-42). Wiley-Blackwell.

Cálix-Lara, T., Rajendran, M., Talcott, S., Stephen, B., Miller, R., Castillo, A., ... Taylor, T. (2014). Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on spinach and identification of antimicrobial substances produced by a commercial Lactic Acid Bacteria food safety intervention. *Food microbiology*, 38, 192-200.

Calo-Mata, P., Arlindo, S., Boehme, K., Miguel, T., Pascoal, A., & Barros-Velazquez, J. (2007). Current Applications and Future Trends of Lactic Acid Bacteria and their Bacteriocins for the Biopreservation of Aquatic Food Products. *Food and Bioprocess Technology*, 1(1), 43-63.

Carroll, C., Alvarado, C., Brashears, L., Thompson, L., & Boyce, J. (2007). Marination of turkey breast fillets to control the growth of *Listeria monocytogenes* and improve meat quality in deli loaves. *Poultry science*, 86, 150-155.

Casaburi, A., Piombino, P., Nychas, G.-J., Villani, F., & Ercolini, D. (2015). Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage. *Food Microbiology*, 45(Part A), 83-102.

Cerf, O. (1977). Tailing of survival curves of bacterial spores. *Journal of applied bacteriology*, 42, 1-19.

Chen, H., & Hoover, D. G. (2003). Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and food safety*, 2, 82-100.

Cheng, Q., & Sun, D.-W. (2008). Factors affecting the water holding capacity of red meat products: a review of recent research advances. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(2), 137-159.

Devlieghere, F., Vermeiren, L., & Debevere, J. (2004). New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, 14(4), 273-285.

Doulgeraki, A. I., Paramithiotis, S., & Nychas, G.-J. E. (2011). Characterization of the Enterobacteriaceae community that developed during storage of minced beef under aerobic

- or modified atmosphere packaging conditions. *International journal of food microbiology*, 145(1), 77-83.
- Geeraerd, A. H., Herremans, C. H., & Van Impe, J. F. (2000). Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International journal of food microbiology*, 59(3), 185-209.
- Geeraerd, A., Valdramidis, V., & Impe, J. Van. (2005). GInaFIT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 95-105.
- Gill, C. O., & Newton, K. G. (1982). Effect of lactic acid concentration on growth on meat of Gram-negative psychrotrophs from a meatworks. *Applied and environmental microbiology*, 43(2), 284-8.
- Grijnspeerdt, K., & Vanrolleghem, P. (1999). Estimating the parameters of the Baranyi model for bacterial growth. *Food Microbiology*, (16), 593-605.
- Hartmann, H. A., Wilke, T., & Erdmann, R. (2011). Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. *International journal of food microbiology*, 146(2), 192-199.
- Honikel, K.-O. (1998). Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Science*, 49(4), 447-457.
- Hughes, J. M., Oiseth, S. K., Purslow, P. P., & Warner, R. D. (2014). A structural approach to understanding the interactions between colour, water-holding capacity and tenderness. *Meat Science*, 98(3), 520-532.
- Hutkins, R. W., & Nannen, N. L. (1993). pH Homeostasis in Lactic Acid Bacteria. *Journal of dairy science*, 76(8), 2354-2365.
- ISO 15214:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria. Colony-count technique at 30 degrees C (1998). International Organization for Standardization (ISO).
- Jacobsen, T., Budde, B. B., & Koch, a G. (2003). Application of *Leuconostoc carnosum* for

- biopreservation of cooked meat products. *Journal of applied microbiology*, 95(2), 242-9.
- Leach, L. M., Ellis, M., Sutton, D. S., McKeith, F. K., & Wilson, E. R. (1996). The growth performance, carcass characteristics, and meat quality of halothane carrier and negative pigs. *Journal of animal science*, 74(5), 934-43.
- Lemay, M.-J., Choquette, J., Delaquis, P. J., Claude, G., Rodrigue, N., & Saucier, L. (2002). Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model. *International journal of food microbiology*, 78(3), 217-26.
- Lücke, F.-K. (2000). Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat science*, 56(2), 105-15.
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., & Leguerinel, I. (2002). On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International journal of food microbiology*, 72(1-2), 107-13.
- Maragkoudakis, P. a, Mountzouris, K. C., Psyrras, D., Cremonese, S., Fischer, J., Cantor, M. D., & Tsakalidou, E. (2009). Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *International journal of food microbiology*, 130(3), 219-26.
- Metaxopoulos, J., Mataragas, M., & Drosinos, E. H. (2002). Microbial interaction in cooked cured meat products under vacuum or modified atmosphere at 4 degrees C. *Journal of applied microbiology*, 93(3), 363-73.
- Nattress, F. M., Yost, C. K., & Baker, L. P. (2001). Evaluation of the ability of lysozyme and nisin to control meat spoilage bacteria. *International journal of food microbiology*, 70(1-2), 111-9.
- O'Sullivan, L., Ross, R. P., & Hill, C. (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, 84(5-6), 593-604.
- Prandi, O., & Escobar, J. E. (1994). *Tecnología e higiene de la carne*. Acribia, S. A.
- Serrazanetti, D. I., Guerzoni, M. E., Corsetti, A., & Vogel, R. (2009). Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli. *Food microbiology*, 26(7), 700-11.

- Shikama, K., & Sugawara, Y. (1978). Autoxidation of native oxymyoglobin. Kinetic analysis of the pH profile. *European journal of biochemistry*, *91*, 407-413.
- Signorini, M. L., Ponce-Alquicira, E., & Guerrero-Legarreta, I. (2006). Effect of lactic acid and lactic acid bacteria on growth of spoilage microorganisms in vacuum-packaged beef. *Journal of Muscle Foods*, *17*, 277-290.
- Tomé, E., Gibbs, P., & Teixeira, P. (2008). Growth control of *Listeria innocua* 2030c on vacuum-packaged cold-smoked salmon by lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*, *121*, 285-294.
- Turgis, M., Stotz, V., Dupont, C., Salmieri, S., Khan, R. a., & La croix, M. (2012). Elimination of *Listeria monocytogenes* in sausage meat by combination treatment: Radiation and radiation-resistant bacteriocins. *Radiation Physics and Chemistry*, *81*(8), 1185-1188.
- UNE 34-557-83: Carnes y productos cárnicos. Investigación y recuento de Enterobacteriaceae. (1983). AENOR.
- UNE-EN ISO 4833-1:2013. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Parte 1: Recuento de colonias a 30°C mediante la técnica de siembra en profundidad. (2014). AENOR.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., Vandekinderen, I., & Debevere, J. (2006). The interaction of the non-bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* 10A and lactocin S producing *Lactobacillus sakei* 148 towards *Listeria monocytogenes* on a model cooked ham. *Food microbiology*, *23*(6), 511-8.
- Wijnker, J. J., Weerts, E. a W. S., Breukink, E. J., Houben, J. H., & Lipman, L. J. a. (2011). Reduction of *Clostridium sporogenes* spore outgrowth in natural sausage casings using nisin. *Food microbiology*, *28*(5), 974-9.
- Winkowski, K., Crandall, A. D., & Montville, T. J. (1993). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus bavaricus* MN in beef systems at Refrigeration Temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, *59*(8), 2552-2557.
- Zhou, G. H., Xu, X. L., & Liu, Y. (2010). Preservation technologies for fresh meat - a review. *Meat science*, *86*(1), 119-28.

CAPÍTULO V

Aplicación de un bioconservante obtenido a partir de un cultivo starter de *P. pentosaceus* en carne de pollo

V. APLICACIÓN DE UN BIOCONSERVANTE OBTENIDO A PARTIR DE UN CULTIVO STARTER DE *P. PENTOSACEUS* EN CARNE DE POLLO

V.1 INTRODUCCIÓN

La carne de pollo tiende a deteriorarse después de 4 - 10 días tras el sacrificio debido a que es muy susceptible al desarrollo de microorganismos, incluso cuando se almacena a temperaturas de refrigeración (Lin et al., 2004; Shin, Harte, Ryser, & Selke, 2010). La alteración microbiana comporta la liberación de diversos compuestos volátiles (aparición de malos olores) y/o la aparición de cambios visibles (presencia de limo superficial) que hacen que el producto sea inaceptable por parte del consumidor (Gram et al., 2002). Algunos microorganismos comúnmente implicados en el deterioro de la carne son *Pseudomonas spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Brochothrix thermosphacta*, y bacterias ácido-lácticas (BAL). La contribución efectiva de cada uno de estos microorganismos en la descomposición, depende en gran medida de las características del almacenamiento (Koutsoumanis et al., 2008). Por ejemplo, las pseudomonas son consideradas como los principales microorganismos alterantes en condiciones de refrigeración (1 a 4°C) para carne de aves de corral almacenadas en condiciones aeróbicas (Doulgeraki, Ercolini, Villani, & Nychas, 2012), mientras que *B. thermosphacta* se convierte en la bacteria dominante junto con las BAL durante el almacenamiento de la carne en atmósfera modificada (Papadopoulou et al., 2012).

El desarrollo de las pseudomonas es particularmente importante en el caso de la carne almacenada bajo condiciones aeróbicas, siendo los principales microorganismos causantes de deterioro, gracias a que por su carácter proteolítico, producen compuestos causantes de olores y sabores desagradables, como sulfuros, ésteres y aminas (Borch, Kant-Muermans, & Blixt, 1996; Casaburi, Piombino, Nychas, Villani, & Ercolini, 2015).

Cuando existen bajas concentraciones de glucosa, las enterobacterias, *B. thermosphacta* o *Shewanella putrefaciens* degradan aminoácidos produciendo

compuestos con olores putrefactos (Knox, van Laack, & Davidson, 2008). *B. thermosphacta* es capaz de crecer en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, por lo cual es común asociarlo al deterioro de la carne envasada en MAP (Doulgeraki et al., 2012; Labadie, 1999). Altas concentraciones de CO₂ ejercen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de este microorganismo, pero esto también depende de otros factores como el pH, la temperatura, la concentración de oxígeno, entre otros (Blickstad, 1983; Mastromatteo, Lucera, Sinigaglia, & Corbo, 2009). *B. thermosphacta* produce una variedad de compuestos (que dependen de la presencia de oxígeno), principalmente los ácidos láctico y acético, acetoina, etanol y ácidos grasos de cadena corta. Estos compuestos causan olores, decoloraciones y malos sabores (Casaburi, De Filippis, Villani, & Ercolini, 2014; Cayré, Garro, & Vignolo, 2005).

En diferentes estudios se ha evaluado el uso de bioconservantes para aumentar la vida útil y garantizar la calidad sanitaria de los productos cárnicos (Cleveland, Montville, Nes, & Chikindas, 2001; McAuliffe & Jordan, 2012), lo cual puede atribuirse en parte, a que los consumidores de hoy en día se inclinan a adquirir productos frescos, sin conservantes y de calidad (Lücke, 2000). La bioconservación se define como la extensión de la vida útil y la seguridad de los alimentos usando su microbiota natural o controlada y/o sus metabolitos antimicrobianos (Hugas, 1998; Reis, Paula, Casarotti, & Penna, 2012). El uso de cepas bioconservantes, así como de los metabolitos producidos por estas, han demostrado ser efectivas en inhibir el desarrollo de diversos microorganismos alterantes o patógenos que pueden estar presentes en los alimentos, alargando así su vida útil e incrementando su seguridad. El uso de BAL en la bioconservación se basa en las propiedades antibacterianas de los productos finales de su metabolismo: ácido láctico, acético, peróxido de hidrógeno, diacetilo, reuterina y bacteriocinas (Hugas, 1998).

La bioconservación puede utilizarse de forma conjunta con otras técnicas de conservación, aplicando lo que se conoce como la tecnología de barreras, que consiste en establecer una serie de factores de conservación selectivos (obstáculos) (Leistner, 2000) que actúan de forma sinérgica, inhibiendo el desarrollo de microorganismos alterantes o

patógenos. Así, el uso de bioconservantes, en conjunto con el almacenamiento a temperaturas de refrigeración y un envasado adecuado, como el envasado en atmósfera modificada (MAP), podrían disminuir las actividades metabólicas específicas de deterioro de las diferentes poblaciones microbianas.

Muchos productos cárnicos son envasados en MAP debido a que permite extender su vida útil durante el almacenamiento en refrigeración (Cervený, Meyer, & Hall, 2010), entre otras razones porque se inhibe o se retarda el crecimiento de microorganismos Gram negativos psicrófilos, como las pseudomonas (Langston, Altman, & Hotchkiss, 1993; Pin, García de Fernando, & Ordóñez, 2002). Durante el almacenamiento pueden producirse cambios en la composición de los gases que seleccionan la microbiota presente hacia microorganismos tolerantes al CO₂ pero de crecimiento lento, como leuconostocs y lactobacilos, los cuales pueden convertirse en la flora alterante dominante (Chenoll, Macián, Elizaquível, & Aznar, 2007). Aunque estos microorganismos, y en general, las BAL pueden producir olores agrios en la carne, se prefiere que se desarrollen estos en vez de microorganismos productores de olores desagradables y putrefactos, como las pseudomonas (Saucier, Gendron, & Gariépy, 2000).

En la bibliografía científica son numerosos los estudios de bioconservación que se centran en el potencial de los metabolitos de las BAL de inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos (principalmente se ha estudiado su efecto sobre *L. monocytogenes*), pero muy pocos se enfocan en su capacidad antimicrobiana sobre microorganismos alterantes presentes en la carne. En este capítulo se evalúa la actividad antimicrobiana del bioconservante P-24FR sobre algunos microorganismos alterantes en carne de pollo picada, así como su aplicación en conjunto con MAP.

V.2 OBJETIVOS

Los objetivos de este capítulo son los siguientes:

- Objetivo general:
 - Determinar la efectividad como bioconservante del extracto libre de células, obtenido del proceso de fermentación de *Pediococcus pentosaceus* y estabilizado por liofilización (L-24FR), en la carne picada de pollo con y sin envasado en atmósfera modificada.

- Objetivos específicos:
 - Determinar el efecto de P-24FR sobre microorganismos alterantes presentes en la carne picada de pollo.
 - Evaluar los cambios en las propiedades fisicoquímicas producidos al añadir P-24FR a la carne picada de pollo.
 - Determinar el efecto sinérgico del bioconservante P-24FR y el uso de MAP sobre microorganismos alterantes presentes en la carne picada de pollo.

V.3 MATERIALES Y MÉTODOS

V.3.1 Plan de trabajo

Para el cumplimiento de los objetivos de este capítulo se estableció el plan de trabajo que se muestra en la Figura V-1, cuyas fases se describen brevemente a continuación.

Fase 1: Efecto de P-24FR sobre la carne picada de pollo

Se evaluó la capacidad antimicrobiana *in vivo* en carne picada de pollo del producto obtenido tras la estabilización por liofilización del caldo de fermentación de 24 h de *P. pentosaceus* (P-24FR), siguiendo el procedimiento descrito en el apartado III.3.4. Se adicionaron diferentes concentraciones del bioconservante en la carne de pollo, para determinar su efecto sobre diferentes microorganismos típicamente presentes en la carne y asociados con alteraciones (aerobios mesófilos, bacterias ácido-lácticas, *Pseudomonas spp.*, *Brochothrix thermosphacta* y enterobacterias). Por otro lado, se determinaron los cambios en las propiedades fisicoquímicas ocurridos como consecuencia de la aplicación de P-24FR.

Fase 2: Efecto de P-24FR sobre la carne picada de pollo en MAP

A partir de los resultados obtenidos en la Fase 1, se seleccionaron las dosis de P-24FR que producían un efecto antimicrobiano adecuado sin alterar de forma significativa las propiedades fisicoquímicas. Estas concentraciones se aplicaron en carne picada de pollo que se envasó en atmósfera modificada (MAP), con la finalidad de determinar el efecto combinado de dicho envasado con la aplicación del bioconservante.

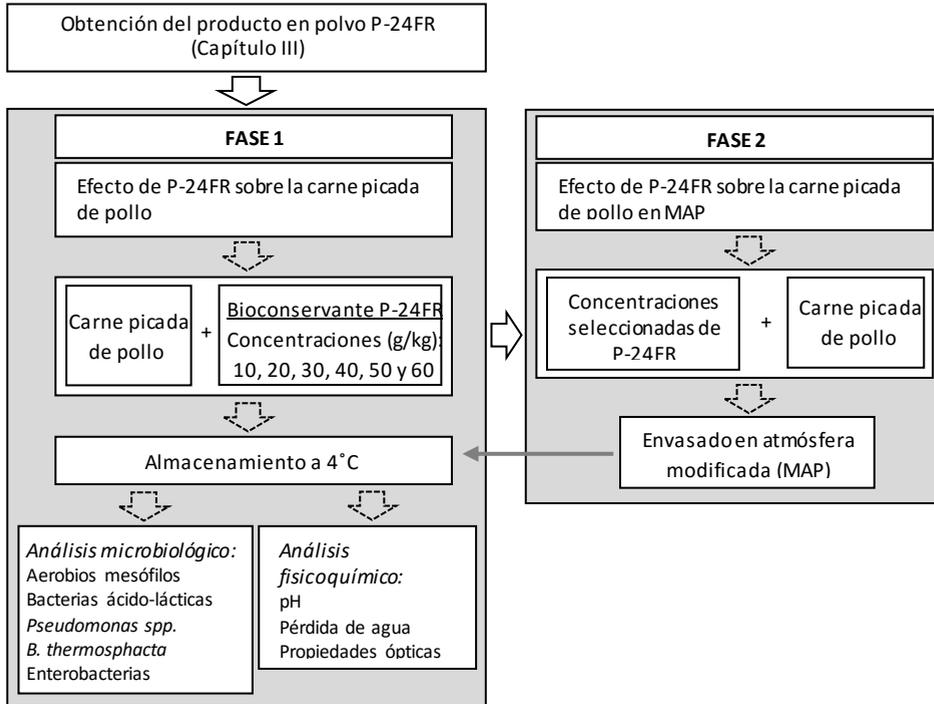


Figura V-1. Plan de trabajo del Capítulo V

V.3.2 Elaboración del bioconservante P-24FR

El bioconservante en polvo P-24FR se obtuvo a partir del cultivo iniciador *Pediococcus pentosaceus*, siguiendo el procedimiento descrito en la sección III.3.4. Explicado de forma breve, para la obtención del bioconservante se inoculó 800 mL de caldo De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (Scharlau, Barcelona, España) con de un cultivo de 24 h de fermentación (2%) de *P. pentosaceus* y se incubó en estufa a 37°C por 24 h. Finalizado este tiempo, el caldo producido se centrifugó (15557g, 10 min, 4°C) y se filtró con membranas de polietersulfona de 0,22 µm para obtener el extracto libre de células (CFE). Luego de adicionar dextrina (Josefa Estellés Mayor S.L., Valencia, España) al 10% (p/v) como soporte, el CFE se liofilizó en un equipo Telstar LyoAlfa-6 (Telstar, Barcelona, España) para obtener un producto en polvo, el cual se envasó a vacío y se almacenó a -18°C hasta su uso.

V.3.3 Efecto de P-24FR sobre carne picada de pollo

Se utilizaron pechugas de pollo compradas en un comercio local, las cuales se picaron en condiciones asépticas en una picadora Moulinex Modelo DP700 (Francia). Se prepararon muestras de 60 g del producto picado con diferentes concentraciones del producto antimicrobiano: 10, 20, 30, 40, 50, 60 g/kg. En cada caso, la mezcla del polvo y la carne se homogeneizó mecánicamente con una espátula durante 2 min, y se almacenó a 4°C en botes estériles con tapa. Se preparó una muestra control compuesta sólo por carne de pollo picada sin antimicrobiano (0 g/kg). Las determinaciones analíticas se realizaron a los 0, 2, 4, 7 y 9 días de almacenamiento.

Para cada concentración se utilizaron dos muestras para ensayos microbiológicos y tres muestras para análisis de fisicoquímicos.

V.3.3.1 *Análisis microbiológico*

V.3.3.1.1 Recuentos microbianos

Se extrajeron asépticamente 10 ± 1 g de cada muestra, que se homogeneizaron en stomacher con agua de peptona tamponada (Scharlau, Barcelona, España). Se prepararon diluciones decimales seriadas para recuento en placa.

Se determinaron aerobios mesófilos en agar Plate Count (PCA) (Scharlau, Barcelona, España) con incubación a 30°C por 72 h (UNE-EN ISO 4833-1:2013), bacterias ácido-lácticas en agar De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (Scharlau, Barcelona, España) incubando a 30°C por 48-72 h (ISO 15214:1998), Enterobacteriaceae en agar Violeta Rojo Bilis Dextrosa (VRBD) (Scharlau, Barcelona, España) con incubación a 37°C por 24 h (UNE 34-557-83), *Brochothrix thermosphacta* en agar STAA (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) incubando a 25°C por 48 h (Cayré et al., 2005) y *Pseudomonas spp.*, en agar Pseudomonas (Scharlau, Barcelona, España) incubado a 25°C por 48 h (Katikou, Ambrosiadis, Georgantelis, Koidis, & Georgakis, 2005).

V.3.3.1.2 Modelización de las curvas de crecimiento e inactivación

Los recuentos obtenidos a los diferentes tiempos se utilizaron para modelizar las curvas de crecimiento, a través del modelo de Baranyi & Roberts (1994), descrito en el apartado IV.3.4.2, utilizando DMFit web-edition de Combase (<http://www.combase.cc/>).

En los casos en que se presentó un comportamiento de inactivación, se utilizó el modelo de Geeraerd, Herremans, y Van Impe (2000) (Ec. IV-1) o el modelo lineal de Bigelow y Esty (1920) (Ec. V-2). Ambos se encuentran incluidos dentro del complemento de Excel GinAfit (A. Geeraerd, Valdramidis, & Impe, 2005):

a. Modelo de Geeraerd, Herremans, y Van Impe (2000):

$$y(t) = \frac{y_0 \cdot e^{-k_{\max} \cdot t} \cdot e^{k_{\max} \cdot S}}{(1 + (e^{k_{\max} \cdot S} - 1)) \cdot e^{-k_{\max} \cdot t}} \quad \text{Ec. V-1}$$

Donde: $y(t)$ = población residual (log ufc/g) a un tiempo t (d), y_0 = población inicial (log ufc/g), k_{\max} = tasa de decrecimiento (log ufc.g⁻¹.d⁻¹), S = duración de la fase hombro (d).

b. Modelo de Bigelow y Esty (1920):

$$y_{\text{res}} = y_0 \cdot e^{-k_{\max} \cdot t} \quad \text{Ec. V-2}$$

Donde: y_0 = población inicial (log ufc/g), y_{res} = población residual (log ufc/g), k_{\max} = tasa de decrecimiento, t = tiempo (d).

En ambos casos, se obtuvieron los parámetros estadísticos coeficiente de correlación (R^2) y el error estándar (SE).

V.3.4 Determinaciones fisicoquímicas

Las determinaciones fisicoquímicas (pH, pérdida de agua por goteo y propiedades ópticas) se realizaron a los 0, 2, 4, 7 y 9 días de almacenamiento a 4°C en muestras preparadas por triplicado.

V.3.4.1 Determinación de pH

Se utilizó un pHmetro micropH 2001 (Crison Instruments, S.A., Barcelona, España) con un electrodo de punción Crison 5231. Se realizaron tres medidas de cada muestra.

V.3.4.2 Pérdida de agua por goteo

Se empleó el método gravimétrico de Honikel (1998), descrito en el apartado IV.3.5.2.

V.3.4.3 Propiedades ópticas

El método utilizado se describe en el apartado IV.3.5.3. Se obtuvieron los espectros de reflectancia y las coordenadas L^* , a^* y b^* , a partir de las cuales se calculó la diferencia de color (ΔE) (Ec. IV.7 del capítulo IV) y el croma ($C_{ab}^*=(a^* + b^*)^{1/2}$).

V.3.5 Efecto de P-24FR en la carne picada de pollo en MAP

Se utilizaron pechugas de pollo compradas en un comercio local, las cuales fueron picadas en condiciones asépticas, en una picadora Moulinex Modelo DP700 (Francia). Se prepararon muestras de 25 g del producto picado con 20 y 30 g/kg de bioconservante. Tras añadir el antimicrobiano, la carne y el producto en polvo se homogeneizaron mecánicamente mediante una espátula durante 5 minutos. Las muestras se moldearon en forma de hamburguesas de 7 cm de diámetro y 2 cm de espesor. De la misma manera se preparó una muestra control compuesta sólo por carne picada de pollo sin producto antimicrobiano. Las muestras se envasaron en atmósfera modificada (MAP) con una mezcla de gases de 22% O₂, 30% CO₂, y 48% N₂, (Carburos Metálicos, Barcelona, España).

El film de sellado estaba formado por PET12/PP/EVOH/PP70 y la barqueta de PP/EVOH/PP, (Ilpra Systems, Mataró, Barcelona, España). El envasado se realizó en un equipo Euromatic Tray 800 (Italia). Las muestras se almacenaron durante nueve días a 4 °C.

Todas las determinaciones analíticas se ejecutaron a los 0, 2, 4, 7 y 9 días. De cada concentración se prepararon muestras por duplicado, tanto para los análisis microbiológicos como para los fisicoquímicos.

V.3.5.1 Determinaciones microbiológicas

Cada muestra de 25 ± 1 g fue asépticamente removida del empaque y se homogeneizó en stomacher con agua de peptona tamponada (Scharlau, Barcelona, España). A continuación se prepararon diluciones decimales seriadas para realizar recuento en placa. Los microorganismos, medios de cultivo y condiciones de incubación fueron idénticos a los mencionados en el apartado V.3.3.1.1.

V.3.5.2 Modelización de las curvas de crecimiento e inactivación

Se utilizó el procedimiento descrito en el apartado V.3.3.1.2.

V.3.5.3 Propiedades fisicoquímicas

Se determinó el pH y las propiedades ópticas (ΔE y C_{ab}^*) utilizando las técnicas descritas en el apartado V.3.4, inmediatamente después de abrir el envase.

V.3.5.4 Concentración de gases en el envase

Para determinar la composición de la atmósfera en el envase durante el experimento, se realizaron medidas por duplicado de la concentración de O₂, CO₂ y N₂ (%v/v) en el espacio de cabeza de este utilizando un analizador de gases CheckMate 9900 (PBI-Dansensor, Ringsted, Dinamarca), perforando el film con una aguja médica de 0,8 mm.

V.3.6 Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos se realizó empleando Statgraphics Centurion XV versión 15.2.06 (Manugistics Corp., Rockville, Md.), con un nivel de confianza de 95%. Para evaluar la significación de los factores y sus interacciones se realizaron ANOVAs. Cuando resultaron significativos, se analizaron las diferencias entre los distintos niveles mediante la prueba de múltiple rangos, utilizando el test de Tukey (HSD) para discriminar entre las medias.

V.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.4.1 Efecto de P-24FR sobre la carne picada de pollo

V.4.1.1 Efecto antimicrobiano de P-24FR en carne picada de pollo

Las curvas de crecimiento de aerobios mesófilos mostraron un comportamiento dependiente de la concentración de P-24FR (Figura V-2). Como se comentó en el capítulo III, la capacidad antimicrobiana de P-24FR se debe a la presencia de ácido láctico y a la reducción del pH.

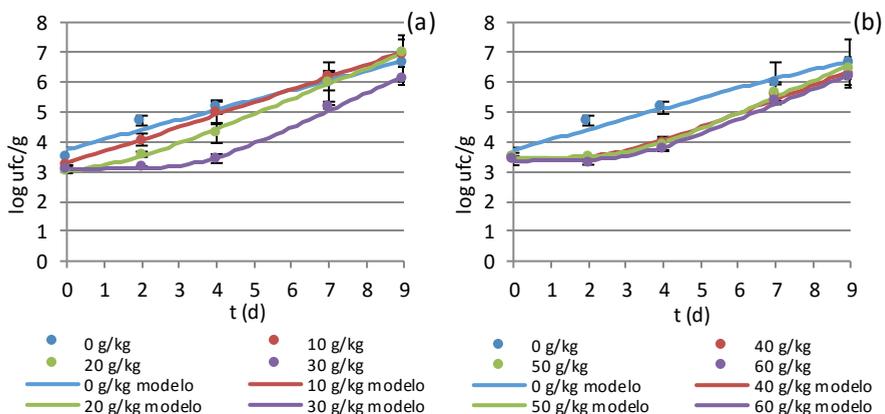


Figura V-2. Curvas de crecimiento de aerobios mesófilos en carne de pollo tratada con P-24FR a concentraciones de 0, 10, 20 y 30 g/kg (a) y 0, 40, 50 y 60 g/kg (b)

En el caso de la carne con 10 g/kg de antimicrobiano, los aerobios mesófilos mostraron un comportamiento lineal (Figura V-2a), alcanzando recuentos finales de 7,02 log ufc/g, similares a los 6,65 log ufc/g de la muestra control (0 g/kg). El efecto antimicrobiano se mantuvo únicamente durante los primeros cuatro días de almacenamiento, gracias a la reducción de los recuentos iniciales (y_0) de $3,8 \pm 0,2$ log ufc/g (0 g/kg) a $3,3 \pm 0,2$ log ufc/g (Tabla V-1). Por otra parte, al emplear 20 y 30 g/kg (Figura V-2a), se pudo observar una inhibición importante del crecimiento, dado que se presentó una fase de latencia de $1,3 \pm 0,7$ y $3,6 \pm 0,3$ d (Tabla V-1), respectivamente. Adicionalmente, la incorporación de 20 g/kg o 30 g/kg bioconservante, permitió disminuir los recuentos microbianos en comparación con la muestra control hasta el séptimo o noveno día de almacenamiento, respectivamente.

Tabla V-1. Parámetros obtenidos de los modelos de crecimiento de aerobios mesófilos en carne de pollo con diferentes concentraciones de P-24FR

Conc. (g/kg)	y_0 (log ufc·g ⁻¹)	y_f (log ufc·g ⁻¹)	λ (d)	μ_{max} (log ufc·g ⁻¹ ·d ⁻¹)	SE	R ²
0*	3,76±0,23	-	-	0,33±0,04	0,432	0,871
10**	3,30±0,15	-	0,2±0,6	0,42±0,03	0,212	0,978
20**	3,03±0,20	-	1,3±0,7	0,51±0,05	0,283	0,968
30**	3,08±0,07	-	3,6±0,3	0,57±0,03	0,123	0,991
40**	3,41±0,15	-	2,8±0,7	0,47±0,06	0,259	0,956
50**	3,46±0,13	-	3,2±0,6	0,54±0,06	0,234	0,968
60**	3,34±0,10	-	3,2±0,5	0,51±0,04	0,180	0,979

*Modelo lineal, **Modelo de Baranyi y Roberts

Al emplear 40, 50 y 60 g/kg (Figura V-2b), se obtuvo un efecto antimicrobiano similar con las tres concentraciones. Al igual que en el caso de las concentraciones de 10, 20 y 30 g/kg, se observó la aparición de una fase de latencia, esta vez con una duración mayor, de aproximadamente 3 días en todos los casos (Tabla V-1). Una vez terminada la fase de latencia, los recuentos en la carne con bioconservante mantuvieron valores inferiores a los de la muestra control durante todo el almacenamiento, excepto al noveno día. En este caso, los recuentos de todas las muestras con bioconservante fueron similares o los de la

muestra control, probablemente debido a que la flora aerobia mesófila que se desarrolla durante el almacenamiento se modifica progresivamente, dominando en el noveno día aquellos microorganismos que son tolerantes a los ácidos o la bajada del pH. Por ello, aunque los recuentos en el noveno día sean similares, la identidad de los microorganismos incluidos en dichos recuentos sería distinta, y dependería de la presencia y concentración del bioconservante. Debe tomarse en cuenta que la evolución en el tiempo de los diferentes grupos microbianos dentro de un producto cárnico depende de una variedad de factores que condicionan cuáles serán los grupos o especies dominantes, lo cual además varía de forma dinámica durante el almacenamiento (Doulgeraki, Paramithiotis, Kagkli, & Nychas, 2010).

La vida útil de la carne de aves de corral puede ser definida en base a los recuentos de microorganismos totales, considerándose que el producto se encuentra alterado cuando se alcanzan concentraciones de $10^7 - 10^8$ ufc/g (Bolton, Meredith, Walsh, & McDowell, 2014). Además, en la legislación vigente se establece el recuento de aerobios mesófilos como un indicador microbiológico considerado como criterio de higiene de los procesos en los alimentos. El reglamento (CE) 1441/2007 establece que los recuentos de colonias en carne picada de aves de corral, destinada a ser consumida cocinada, deben estar entre 5,70 (m) y 6,70 (M) log ufc/g (m = valor umbral y M = valor límite para un plan de muestreo conformado por 5 unidades). La adición de bioconservante ayudaría a mantener los recuentos dentro de los límites mencionados durante el periodo de almacenamiento estudiado, puesto que, como se observa Figura V-2, retarda el desarrollo de este grupo de microorganismos, especialmente a concentraciones iguales o superiores a 30g/kg.

El comportamiento de la flora ácido-láctica para las distintas muestras analizadas se puede observar en la Figura V-3. La adición de bioconservante, retardó el desarrollo de las BAL, dado el incremento de la fase de latencia a medida que se aumentó la concentración utilizada (Tabla V-2), de forma similar a lo encontrado con los aerobios mesófilos.

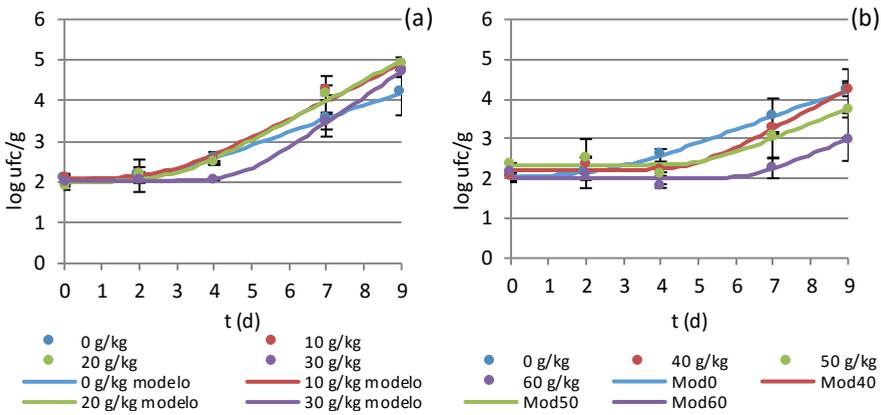


Figura V-3. Curvas de crecimiento de bacterias ácido-lácticas (BAL) en carne de pollo tratada con P-24FR a concentraciones de 0, 10, 20 y 30 g/kg (a) y 0, 40, 50 y 60 g/kg (b)

Tabla V-2. Parámetros de crecimiento del modelo de Baranyi & Roberts (1994) de bacterias ácido-lácticas en carne de pollo con diferentes concentraciones de P-24FR

Conc. (g/kg)	y_0 (log ufc·g ⁻¹)	y_f (log ufc·g ⁻¹)	λ (d)	μ_{max} (log ufc·g ⁻¹ ·d ⁻¹)	SE	R ²
0	2,05±0,22	4,55±2,37	2,6±1,6	0,35±0,13	0,342	0,863
10	2,09±0,19	-	2,8±0,9	0,45±0,07	0,227	0,967
20	2,00±0,14	-	2,9±0,7	0,45±0,05	0,175	0,983
30	2,03±0,02	-	4,7±0,2	0,62±0,02	0,038	0,999
40	2,21±0,10	-	4,9±0,8	0,49±0,11	0,157	0,97
50	2,33±0,10	-	5,2±1,2	0,38±0,15	0,206	0,899
60	2,02±0,10	-	6,4±0,8	0,38±0,14	0,178	0,835

En el caso de las concentraciones de 10, 20 y 30 g/kg (Figura V-3a) se produjeron mayores recuentos finales que en la muestra control, siendo este un comportamiento similar al observado con L-24FR en la carne de cerdo en el apartado IV.4.1. Dado que el efecto antimicrobiano de P-24FR, se debe a la presencia de ácido láctico y la disminución del pH, las BAL estarían afectadas en menor medida que otros grupos de microorganismos, gracias a que toleran concentraciones importantes de ácido láctico y pueden crecer en un entorno acidificado (Knox et al., 2008; Parada, Ricoy Caron, Medeiros, & Soccol, 2007), lo cual les aportaría una ventaja competitiva para crecer en la carne con el bioconservante.

En el caso de la muestra control, la ausencia de P-24FR permitiría el crecimiento de otros microorganismos que competirían con las BAL por nutrientes o que inhibirían su desarrollo, de modo que en este caso su crecimiento sería menor al que alcanzarían en presencia del bioconservante.

Este comportamiento dependería de la concentración de ácido, ya que con 50 y 60 g/kg (Figura V-3b) los recuentos finales fueron considerablemente menores que con las concentraciones de 10, 20 y 30 g/kg. Adicionalmente las fases de latencia fueron más largas, lo cual indica que la tolerancia de las BAL al ácido láctico y al descenso del pH sería limitada. Posiblemente, esto se deba al daño celular que causa mantener el medio en un pH bajo, produciendo una pérdida de viabilidad y un descenso en la velocidad de crecimiento (Hutkins & Nannen, 1993). Esta diferencia entre las concentraciones altas y bajas de bioconservante también fue observado en la carne picada de cerdo con L-24FR, en el apartado IV.4.1.

Las ventajas competitivas de las BAL de crecer a pH bajo y en refrigeración, además de la capacidad de producir sustancias antimicrobianas, les permitirían convertirse en la flora microbiana dominante en ciertas condiciones (Cálix-Lara et al., 2014; Doulgeraki et al., 2012), aunque crecen a una velocidad menor que otros microorganismos alterantes en frío (Knox et al., 2008). En cualquier caso, la proliferación de bacterias ácido lácticas, no representa un peligro desde el punto de vista de la seguridad alimentaria a pesar de ser microorganismos alterantes.

En el caso de *Pseudomonas* spp. (Figura V-4), se observó ausencia de fase de latencia en la muestra control, a diferencia de la carne con bioconservante (Tabla V-3). Este retraso en la capacidad de multiplicación de los microorganismos debido al antimicrobiano, es similar al encontrado con los aerobios mesófilos y las BAL. Estas últimas, estarían desfavorecidas por el proceso de aireación de la carne durante el proceso de picado, que beneficiaría el crecimiento de las pseudomonas (Nassos, King, & Stafford, 1983). Dado el rápido crecimiento de estos microorganismos en condiciones aeróbicas (Borch et al., 1996), podrían convertirse en parte de la flora dominante en carne picada. Además, según

los resultados de Gill y Newton (1982), estos microorganismos crecen con facilidad a pH entre 5,5 y 6, pudiendo utilizar el ácido láctico como sustrato (en ausencia de glucosa) (Casaburi et al., 2015), por lo que su proliferación en la carne estaría favorecida con el bioconservante P-24FR, especialmente a concentraciones bajas. Por estas razones, la población de pseudomonas podría haber conseguido igualar o superar a la de la muestra control al final del almacenamiento (Figura V-4), lo cual es un comportamiento similar al observado con las BAL, discutido anteriormente.

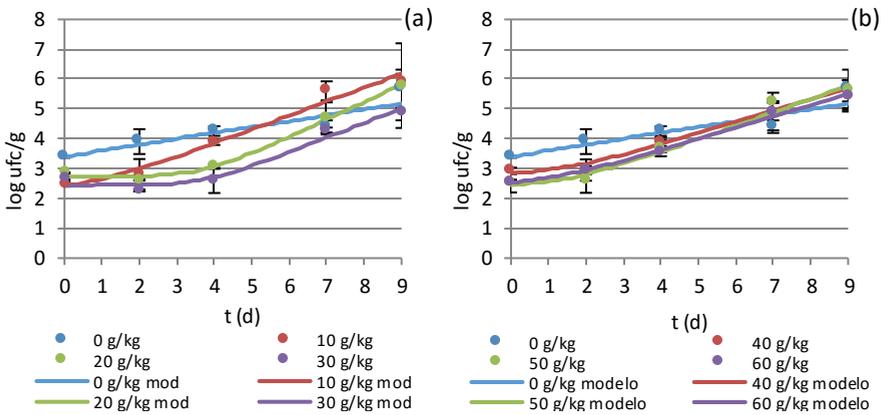


Figura V-4. Crecimiento de *Pseudomonas spp.* en carne de pollo tratada con P-24FR a concentraciones de 0, 10, 20 y 30 g/kg (a) y 0, 40, 50 y 60 g/kg (b)

Tabla V-3. Parámetros del modelo de crecimiento de Baranyi & Roberts (1994) de *Pseudomonas spp.* en carne de pollo con diferentes concentraciones de P-24FR

Conc. (g/kg)	y_0 (log ufc·g ⁻¹)	y_f (log ufc·g ⁻¹)	λ (d)	μ_{max} (log ufc·g ⁻¹ ·d ⁻¹)	SE	R ²
0*	3,41±0,18	-	-	0,20±0,04	0,340	0,771
10**	2,44±0,25	-	1,0 ± 0,9	0,47±0,06	0,360	0,943
20**	2,73±0,10	-	3,7±0,5	0,58±0,05	0,134	0,991
30**	2,46±0,22	-	4,3±1,6	0,68±0,38	0,318	0,926
40**	2,84±0,23	-	1,4±1,1	0,37±0,06	0,338	0,915
50**	2,45±0,23	-	1,6±1,0	0,45±0,06	0,340	0,939
60**	2,54±0,25	-	1,2±1,2	0,38±0,06	0,354	0,354

*Modelo lineal, **Modelo de Baranyi y Roberts

Además de su rápido crecimiento, y su capacidad de tolerar pHs ácidos, las *presudomonas* cuentan con otra ventaja frente a otros microorganismos, la capacidad de producir sideróforos, los cuales son secuestrantes del hierro que tienen además un efecto antibiótico. Por otra parte, se conoce que algunas *pseudomonas* son capaces de producir sustancias antimicrobianas, incluyendo bacteriocinas (por ejemplo la piocina, producida por *Pseudomonas aeruginosa*) (Gram, 1993).

Las curvas de crecimiento de *B. thermosphacta* (Figura V-5) de las muestras con P-24FR mostraron diferencias con respecto a la muestra control en función de la dosis de bioconservante utilizada, siendo visiblemente más marcadas a medida que aumentó la concentración de P-24FR. Para dosis de 10 y 20 g/kg los recuentos alcanzados fueron similares a los de la muestra control, excepto por la aparición de una fase de latencia de ~1 día con 20 g/kg de P-24FR (Tabla V-4). La fase de latencia aumentó al aplicar concentraciones de 30 y 40 g/kg, con una duración aproximada de 4 y 6 días, respectivamente. Al aplicar 50 g/kg se obtuvo un efecto bacteriostático con una fase de hombro de $7,6 \pm 0,8$ d y posteriormente un efecto bactericida, dado que se produjo una velocidad máxima decreciente ($k_{max} = -0,8 \pm 0,4 \log \text{ufc} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). Al aumentar la concentración a 60 g/kg, el efecto bactericida fue constante desde el inicio del almacenamiento, con una k_{max} de $-0,09 \log \text{ufc} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$.

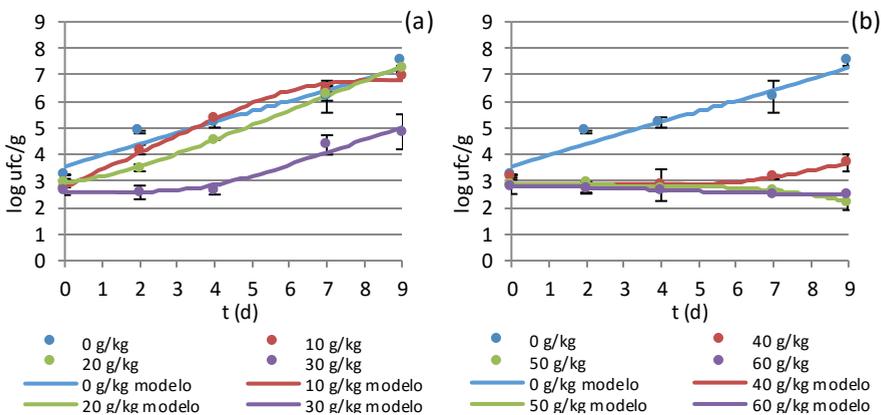


Figura V-5. Crecimiento de *Brochothrix thermosphacta* en carne de pollo tratada con P-24FR a concentraciones de 0, 10, 20 y 30 g/kg (a) y 0, 40, 50 y 60 g/kg (b)

Tabla V-4. Parámetros de los modelos de crecimiento e inactivación de *B. thermosphacta* en carne de pollo con diferentes concentraciones de P-24FR

Conc. (g/kg)	Y_0 (log ufc·g ⁻¹)	Y_f (log ufc·g ⁻¹)	λ/S (d)	μ_{max}/K_{max} (log ufc·g ⁻¹ ·d ⁻¹)	SE	R ²
0*	3,54±0,23	-	-	0,42±0,05	0,42	0,909
10**	2,79±0,14	6,81 ± 0,14	-	0,64±0,05	0,22	0,982
20**	2,96±0,10	-	1,2±0,3	0,56±0,02	0,144	0,993
30**	2,58±0,20	-	3,8±1,2	0,47±0,11	0,373	0,878
40**	2,89±0,13	-	6,1±1,5	0,27±0,17	0,23	0,635
50***	2,84±0,07	-	7,6±0,8	-0,81±0,38	0,148	0,783
60****	2,82±0,07	-	-	-0,09±0,03	0,141	0,483

*Modelo lineal, **Modelo de Baranyi y Roberts, ***Modelo de Geeraerd, Valdramidis y Van Impe, ****Modelo lineal Bigelow y Esty.

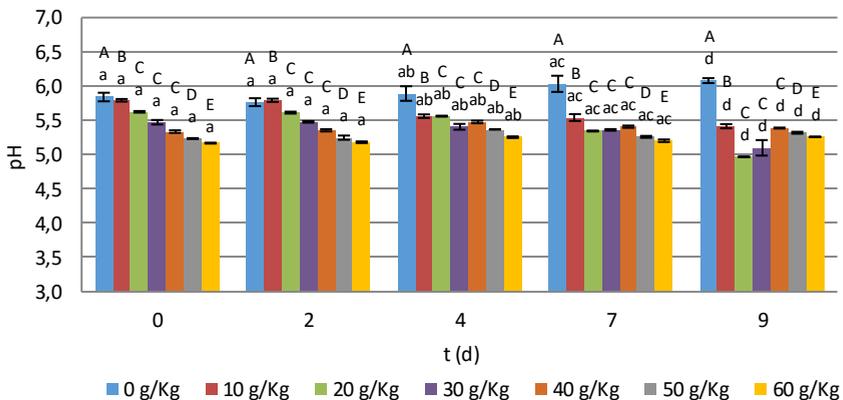
Estos resultados indican que el crecimiento de *B. thermosphacta* estuvo considerablemente afectado por P-24FR a concentraciones entre 30 y 60 g/kg, a diferencia de lo observado con las BAL (Figura V-3) y *Pseudomonas spp.* (Figura V-4), con las cuales el efecto antagónico obtenido no fue tan relevante. Debe considerarse que la interacción de los diferentes grupos de microorganismos alterantes en el producto cárnico (como *Pseudomonas spp.*, BAL y enterobacterias) así como las condiciones de almacenamiento, determinan la población que alcanzan cada uno de ellos, bien sea por un efecto antagónico o por un efecto competitivo (Gram, 1993). Russo et al. (2006), observaron que al incubar *B. thermosphacta* en medio de cultivo con BAL, su crecimiento estuvo negativamente afectado, posiblemente debido a un efecto antagónico. Esta relación entre las BAL y *B. thermosphacta* dependería además del pH del medio. Así, Blickstad (1983) observó que el crecimiento de *B. thermosphacta* ATCC-11509T a pH de 6,3 estaba favorecido sobre el de *Lactobacillus viridescens*, sin embargo, ocurría lo contrario cuando el pH del medio era 5,8. En dicho estudio se indica que el crecimiento de *B. thermosphacta* en condiciones aeróbicas decrece sustancialmente a pH 5,3. Posiblemente, gracias a ello, aunque la población de *B. thermosphacta* (Figura V-5) de la muestra control es considerablemente mayor que el de las BAL (Figura V-3), al incorporar P-24FR, el cambio a pH más ácidos favorece el crecimiento de las BAL.

Los recuentos de *Enterobacteriaceae* en todas las muestras analizadas fueron inferiores a 10 ufc/g (resultados no mostrados) durante todo el período de almacenamiento.

V.4.1.2 Cambios fisicoquímicos en la carne de pollo al incorporar P-24FR

V.4.1.2.1 Efecto sobre el pH

En la Figura V-6 se muestran los valores de pH durante el almacenamiento. En la muestra control el pH se incrementó ligeramente durante el almacenamiento, lo cual ha sido observado también por Allen et al. (1997) en filetes de pollo. Esto se debe a que las proteínas de la carne serían hidrolizadas por enzimas endógenas y microbianas, produciendo péptidos y aminoácidos que serían luego degradados a aminas y aminoácidos, lo cual eleva el pH (Doyle & Beuchart, 2007).



*Letra diferente indica diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test de Fischer en el ANOVA multifactorial. Mayúscula: factor Concentración. Minúscula: factor tiempo.

Figura V-6. Cambios en el pH de la carne picada de pollo con diferentes concentraciones de P-24FR

Los valores de pH obtenidos en este estudio fueron similares a los indicados por otros autores en carne de pollo (Allen et al., 1997; Qiao, Fletcher, Northcutt, & Smith, 2002). El análisis estadístico mostró un efecto significativo de los factores tiempo y concentración, con interacción significativa entre ambos factores ($p < 0,001$, $F = 23,73$), posiblemente

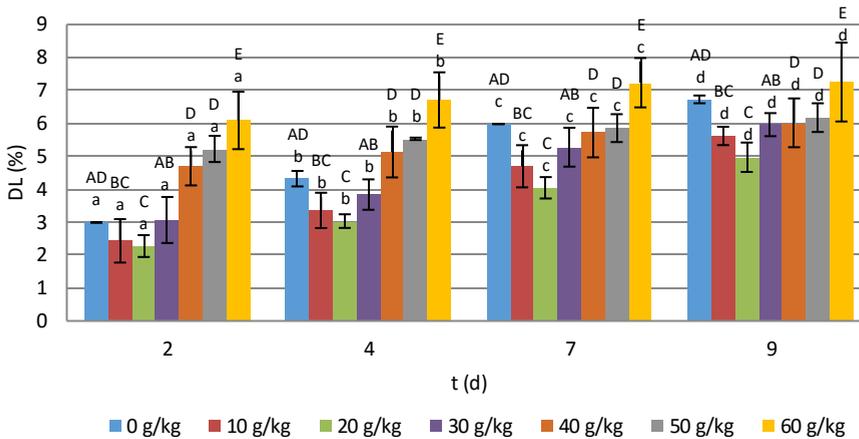
debido a que el pH de la muestra control aumenta en el tiempo, a diferencia de las muestras con el bioconservante. En este caso, se observaron pHs más bajos a medida que aumentó la concentración de P-24FR ($p < 0,001$, $F = 419,87$), debido a la presencia del ácido láctico en el producto (cuantificado en el apartado III.4.2.1.2). La disminución del pH en el tiempo ($p < 0,001$, $F = 20,54$) para las muestras con el bioconservante, puede deberse a la difusión progresiva del bioconservante durante el almacenamiento y a la proliferación de microorganismos productores de ácidos, como las BAL, las cuales se encuentran poco inhibidas por la adición de P-24FR (apartado V.4.1.1). La reducción del pH conlleva, desde el punto de vista tecnológico y sensorial, una disminución de la capacidad de retención de agua y cambios en las propiedades ópticas (Fletcher, 1999).

V.4.1.2.2 Perdida de agua

La pérdida de agua por goteo (DL) estuvo significativamente afectada por la concentración ($p < 0,001$, $F = 34,33$) de bioconservante utilizada, lo cual puede observarse en la Figura V-7. Debe considerarse que la reducción del pH produce una disminución de la capacidad de retención de agua a medida que su valor desciende hacia el punto isoeléctrico de las proteínas miofibrilares, siendo 5,1 para la carne de pollo y aves de corral (Alvarado & McKee, 2007).

Se observó una reducción significativa de DL con respecto a la muestra control cuando se utilizaron concentraciones de 10 y 20 g/kg, lo cual puede deberse a que la capacidad de retención de agua aumentaría gracias a la incorporación de dextrina, el soporte utilizado para la elaboración del bioconservante. De esta manera, el agua retenida dependería de dos efectos opuestos, por una parte la pérdida de agua debida a la disminución del pH y por otra, la capacidad de absorber agua de la dextrina. Este último efecto estaría favorecido con 10 y 20 g/kg de bioconservante, dado que con estas concentraciones no se produjo un descenso muy marcado en el pH (Figura V-6), por lo cual la capacidad de retención de agua no estaría tan afectada como a concentraciones mayores. Cuando se utilizaron 30, 40, 50 y 60 g/kg de bioconservante, el efecto de la adición de la dextrina se minimizaría, dado que se observaron mayores pérdidas de agua al aumentar la

concentración de P-24FR, siendo de hasta un 7,3% el noveno día cuando se utilizó 60 g/kg. La pérdida de agua aumentó significativamente en el tiempo ($p < 0,001$, $F = 51,97$) con todas las concentraciones, inclusive con la muestra control (0 g/kg), pero sin interacción significativa entre los factores ($p = 0,0686$, $F = 1,86$).



*Letra diferente indica diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test de Tukey en el ANOVA multifactorial. Mayúscula: factor Concentración. Minúscula: factor tiempo.

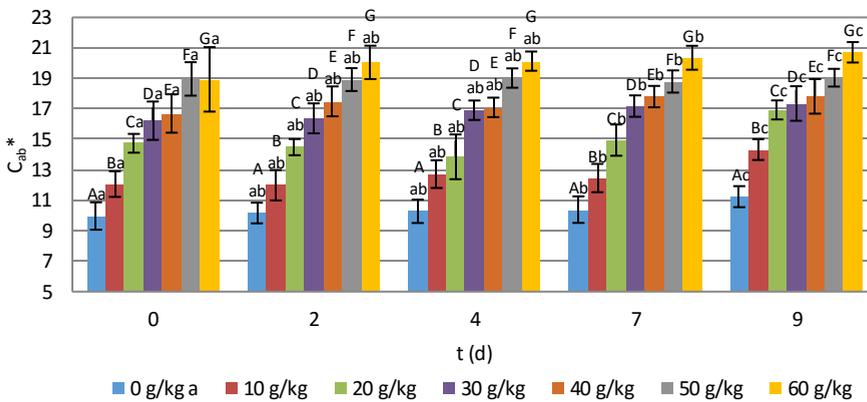
Figura V-7. Pérdida de agua por goteo (DL) en carne picada de pollo con diferentes concentraciones de P-24FR

En la Figura V-7 se observa que para los tiempos más largos, las pérdidas de agua entre las diferentes muestras tienden a igualarse. Realizando un ANOVA simple para cada tiempo (resultados no mostrados), se obtuvieron diferencias significativas entre las concentraciones a los 2, 4 y 7 días ($p < 0,05$), mientras que en el noveno día no se observaron diferencias significativas ($p = 0,0768$).

V.4.1.2.3 Propiedades ópticas

La adición de P-24FR produjo un aumento en las coordenadas a^* y b^* , lo cual se tradujo en un incremento significativo del croma ($p < 0,001$, $F = 715,70$), indicado en la Figura V-8. Cabe mencionar que el bioconservante en polvo, una vez hidratado adquiere una coloración parda, por lo cual, mayores concentraciones del producto producen un mayor

pardeamiento, lo cual también fue observado en el capítulo IV al aplicar L-24FR en carne de cerdo (apartado IV.4.2.3). Por otra parte, se ha observado en otros estudios que los parámetros de color a^* y b^* en la carne de pollo se relacionan con los valores de pH (Allen et al., 1997), posiblemente debido a los cambios en el estado de la mioglobina (Hughes, Oiseth, Purslow, & Warner, 2014). Se observó una tendencia en las muestras a un aumento de C_{ab}^* en el tiempo ($p < 0,001$, $F = 24,61$), siendo también significativa la interacción entre las variables concentración y tiempo ($p < 0,001$, $F = 2,83$).



*Letra diferente indica diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test de Tukey en el ANOVA multifactorial. Mayúscula: factor Concentración. Minúscula: factor tiempo.

Figura V-8. Cromo (C_{ab}^*) durante el almacenamiento de la carne de pollo tratada con diferentes concentraciones de P-24FR

Los cambios observados en el color durante el almacenamiento pueden apreciarse de forma cualitativa mediante los espectros de reflectancia de la Figura V-9. Al comparar los espectros de los 0 y 9 días se observa como el color varía de una forma dinámica en el transcurso del almacenamiento. Al inicio ($t = 0$ d, Figura V-9a), se aprecia un cambio evidente en las longitudes de onda entre los azules y verdes (400 – 550 nm aproximadamente), adoptando valores más bajos a medida que aumentó la concentración de P-24FR. Algo opuesto ocurrió con los naranjas y rojos, ya que la reflectancia aumentó con la concentración para λ entre 630 y 720 nm. Sin embargo, al final del almacenamiento (Figura V-9b), los espectros muestran diferencias notables en toda la región del visible,

donde resalta la diferencia entre las concentraciones bajas de 10 y 20 g/kg, y las concentraciones altas, de 40, 50 y 60 g/kg, dejando el espectro de 30 g/kg en una zona intermedia. Además del efecto que produce el bioconservante, la modificación del color durante el almacenamiento son dependientes del estado de oxidación-reducción de la mioglobina (como se ha mencionado anteriormente) y de la oxidación de los lípidos (Allen et al., 1997).

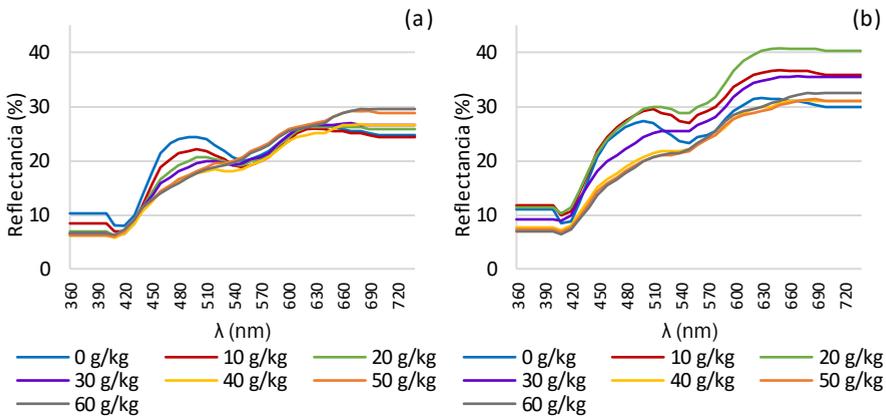
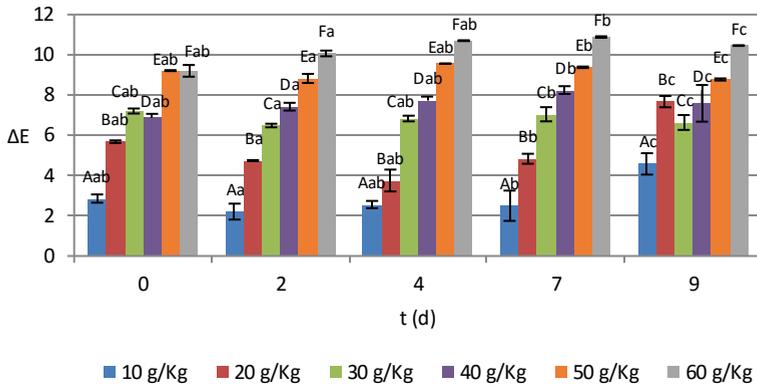


Figura V-9. Espectros de reflectancia de la carne de pollo con diferentes concentraciones de P-24FR, (a) a los 0 días y (b) a los 9 días de almacenamiento

Los cambios en el color de la carne de pollo se cuantificaron en función de la diferencia de color (ΔE) (Figura V-10). Al aumentar la concentración de bioconservante, se incrementaron las diferencias de forma significativa ($p < 0,001$, $F = 388,80$). El tiempo de almacenamiento también mostró ser significativo ($p < 0,001$, $F = 10,75$), especialmente para 0 y 10 g/kg. Se obtuvo una interacción significativa entre ambos factores ($p < 0,001$). Estos resultados son similares a los encontrados en el capítulo IV para la carne de cerdo tratada con L-24FR (IV.4.2.3).



*Letra diferente indica diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test de Tukey en el ANOVA multifactorial. Mayúscula: factor Concentración. Minúscula: factor tiempo.

Figura V-10. Diferencias de color (ΔE) calculadas con respecto a la muestra control (0 g/Kg) durante el almacenamiento de la carne picada de pollo tratada con P-24FR a diferentes concentraciones (g/kg)

V.4.2 Efecto del bioconservante P-24FR en la carne de pollo envasada en atmósfera modificada (MAP)

Los resultados del apartado V.4.1 mostraron una inhibición importante de aerobios mesófilos, *Pseudomonas spp.* y *B. thermosphacta* respecto a la muestra control, cuando se utilizaron 20 y 30 g/kg de bioconservante. A su vez, con dichas concentraciones se consiguieron cambios menos notables en las propiedades fisicoquímicas, a diferencia de lo observado con las concentraciones de 40, 50 y 60 g/kg. Con el fin de aumentar la vida útil de un producto cárnico preparado con el bioconservante, se envasó la carne de pollo picada con concentraciones de 20 y 30 g/kg en atmósfera modificada (MAP) para evaluar los cambios fisicoquímicos y microbiológicos que se producen en estas condiciones durante el almacenamiento en refrigeración.

V.4.2.1 Efecto sobre la flora microbiana de la carne picada de pollo en MAP

La curva de crecimiento de los aerobios mesófilos en la muestra control (Figura V-11), presentó una tendencia lineal, sin fase de latencia ni estacionaria. Por el contrario, al

adicionar P-24FR, se obtuvo un efecto antimicrobiano dada la presencia de una fase de latencia de 3 – 4 días (Tabla V-5).

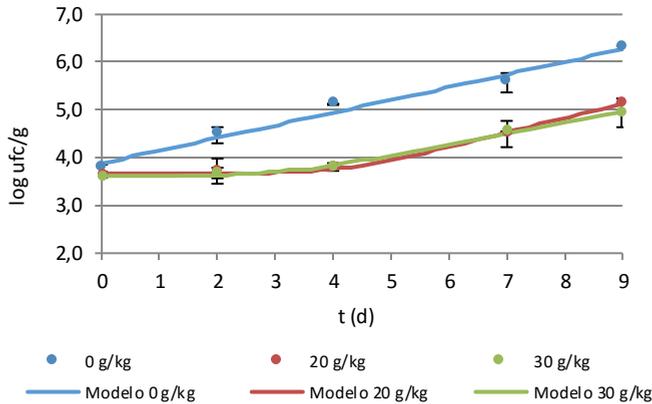


Figura V-11. Curvas de crecimiento de aerobios mesófilos en carne de pollo en MAP con diferentes concentraciones de P-24FR

Tabla V-5. Parámetros de los modelos de crecimiento de aerobios mesófilos en carne de pollo envasada en MAP con diferentes concentraciones de P-24FR

Conc. (g/kg)	y_0 (log ufc.g ⁻¹)	y_f (log ufc.g ⁻¹)	λ (d)	μ_{max} (log ufc.g ⁻¹ .d ⁻¹)	SE	R ²
0*	3,89±0,01	-	-	0,26±0,02	0,167	0,967
20**	3,67±0,07	-	4,3±0,7	0,31±0,03	0,137	0,953
30**	3,61±0,18	-	3,2±1,8	0,23±0,08	0,311	0,752

*Modelo lineal, **Modelo de Baranyi y Roberts

El crecimiento microbiano en presencia del bioconservante presentó un comportamiento similar durante todo el almacenamiento, consiguiéndose en todo momento recuentos inferiores a los obtenidos en la muestra control, del orden de 1 log ufc/g. Al comparar el desarrollo de estos microorganismos en la carne de pollo en MAP (Figura V-11) y sin MAP (Tabla V-1) se observó que en la muestra control se produjo una velocidad de crecimiento ligeramente menor con MAP (~0,07 log ufc.g⁻¹.d⁻¹), partiendo de y_0 similares. En el caso de 20 g/kg se produjo un incremento de la fase de latencia con el uso de MAP (~3 días) y una reducción de la velocidad de crecimiento (~0,2 log ufc.g⁻¹.d⁻¹).

¹), mientras que con 30 g/kg prácticamente sólo se detectó una reducción de la μ_{\max} (0,34 $\log \text{ufc} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). Al cabo de nueve días de almacenamiento la reducción en los recuentos de aerobios mesófilos fue de 1 y 2 $\log \text{ufc/g}$, cuando se utilizó MAP con las dosis de 20 y 30 g/kg, respectivamente, mientras que sin MAP prácticamente no se produjo reducción. Estos resultados resaltan la importancia de combinar técnicas de conservación que permitan un efecto sinérgico en el alargamiento de la vida útil de los productos. Muchas bacterias aerobias son generalmente inhibidas por concentraciones iguales o mayores a 20% de CO_2 , por lo que la vida útil de la carne de pollo se incrementa con la concentración de dicho gas (Cortez-Vega, Pizato, & Prentice, 2012).

Los recuentos de bacterias ácido-lácticas (Figura V-12), apenas mostraron un efecto del bioconservante con respecto a la muestra control. Estos resultados son similares a los obtenidos en el apartado V.4.1, en la carne picada de pollo sin MAP.

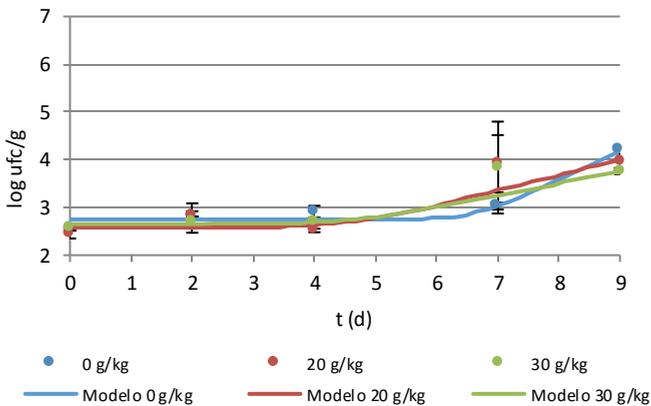


Figura V-12. Curvas de crecimiento de BAL en pollo envasado en MAP y con diferentes concentraciones de P-24FR

En la muestra control con MAP (Figura V-12) se produjo una extensión importante de la fase de latencia de las BAL de $6,6 \pm 0,3$ días (Tabla V-6), un valor considerablemente mayor al obtenido sin MAP, de $2,6 \pm 1,6$ días (Tabla V-2). Al aplicar el bioconservante, el envasado en MAP mejoraría la vida útil de la carne con 20 g/kg, dado que se incrementó la fase de latencia (en $\sim 1,8$ días) y se redujo la velocidad de crecimiento (en $\sim 0,13 \log \text{ufc} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$).

$1 \cdot d^{-1}$) con respecto a la carne con la misma concentración de P-24F sin MAP. En cambio, con 30 g/kg se produjo un aumento de μ_{max} ($0,37 \log ufc \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$) al utilizar MAP, de forma que en este caso no se produjeron ventajas al utilizar la atmósfera modificada.

Tabla V-6. Parámetros de crecimiento de las bacterias ácido-lácticas según el modelo de Baranyi & Roberts (1994) en carne de pollo envasada en MAP, con diferentes concentraciones de P-24FR

Conc. (g/kg)	y_0 ($\log ufc \cdot g^{-1}$)	y_f ($\log ufc \cdot g^{-1}$)	λ (d)	μ_{max} ($\log ufc \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$)	SE	R ²
0	2,75±0,07	-	6,61±0,3	0,60±0,09	0,160	0,929
20	2,58±0,01	-	4,66±1,1	0,32±0,09	0,213	0,883
30	2,65±0,05	-	4,66±0,74	0,25±0,05	0,109	0,947

Los resultados obtenidos indican que las BAL no estarían inhibidas por el bioconservante, sin embargo, la atmósfera modificada (22% O₂, 30% CO₂, 48% N₂) extendió la fase de latencia con 20 g/kg de P-24FR y en la muestra control. Estos resultados son similares a los encontrados por Esmer et al. (2011) en carne de vacuno con una atmósfera similar (30%O₂, 30%CO₂, 40%N₂), pero difiere de los resultados de Mastromatteo et al. (2009) en carne picada de aves envasada en diferentes combinaciones de O₂ y CO₂, quienes encontraron un crecimiento sostenido de este grupo de microorganismos.

Las pseudomonas son microorganismos que tienen una alta sensibilidad hacia el CO₂. Valores iguales o mayores a 20% de CO₂ en la composición de la atmósfera del envase permiten una inhibición importante de estos microorganismos (Esmer et al., 2011). Es por ello que en la muestra control, utilizando MAP (Figura V-13), se obtuvo una estabilización de los recuentos (fase estacionaria) a partir de los 4 días de almacenamiento, mientras que sin MAP (Figura V-4) se obtuvo un crecimiento lineal hasta aproximadamente 5 log ufc/g, lo que representa una unidad logarítmica más de la alcanzada con atmósfera modificada.

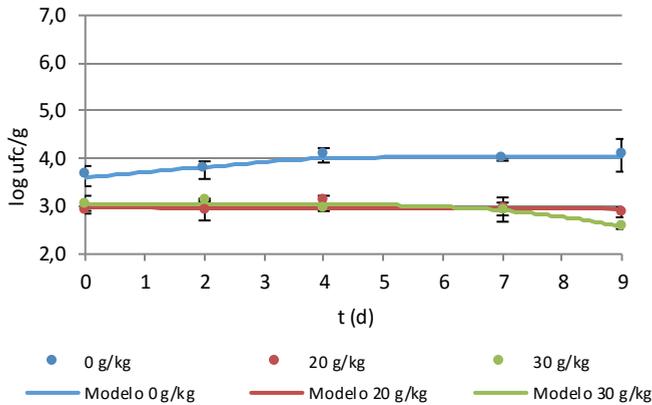


Figura V-13. Curvas de crecimiento de *Pseudomonas spp.* en carne de pollo envasada en MAP y con diferentes concentraciones de P-24FR

Al aplicar el bioconservante (Figura V-13), los recuentos permanecieron en general estables durante el almacenamiento, de forma similar a lo observado en la muestra control. Este comportamiento no fue observado para las pseudomonas en la carne con P-24FR sin MAP (Figura V-4), obteniéndose en este caso un crecimiento sostenido de estos microorganismos. Por tanto, la atmósfera modificada en conjunto con P-24FR ejerció un efecto significativo en la inhibición de las pseudomonas, produciéndose una importante reducción de y_0 y una reducción de los recuentos del orden de una unidad logarítmica durante la mayor parte del almacenamiento (Figura V-14). Específicamente, al utilizar 20 g/kg de bioconservante, se mantuvo un comportamiento lineal ligeramente decreciente con una velocidad de decrecimiento prácticamente nula (Tabla V-7), mientras que con 30 g/kg se produjo una fase de hombro y un decrecimiento importante a partir del séptimo día.

Tabla V-7. Parámetros de los modelos de crecimiento e inactivación de *Pseudomonas spp.* en carne de pollo en MAP, con diferentes concentraciones de P-24FR

Conc. (g/kg)	Y_0 (log ufc·g ⁻¹)	Y_f (log ufc·g ⁻¹)	λ (d)	μ_{max} (log ufc·g ⁻¹ ·d ⁻¹)	SE	R ²
0*	3,60±0,13	4,04±0,09	-	0,11±0,07	0,187	0,410
20**	2,98±0,08	-	-	-0,01±0,01	0,143	0,018
30***	3,06±0,06	-	8,1±0,6	-0,82±0,44	0,017	0,751

*Modelo de Baranyi y Roberts, **Modelo Lineal, ***Modelo de Geeraerd, Herremans y Van Impe

El efecto de la atmósfera modificada sobre el crecimiento de *B. thermosphacta* puede observarse al comparar la muestra control en MAP (Figura V-14) y sin MAP (Figura V-5). En la muestra control, al utilizar MAP se obtuvo una reducción de los recuentos al final del almacenamiento de aproximadamente dos unidades logarítmicas, alcanzándose además la fase estacionaria, lo cual no se observó en la carne sin MAP (Tablas V-8 y V-4).

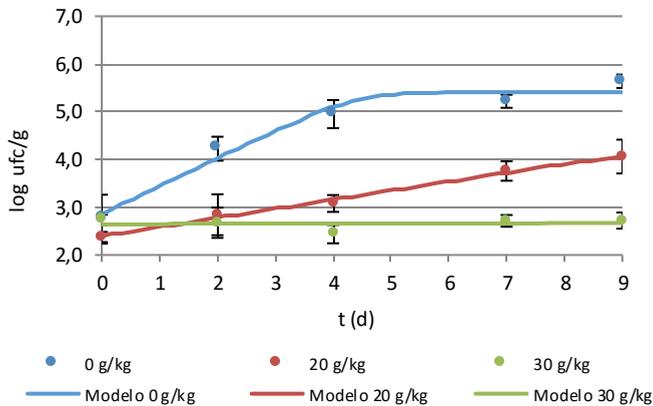


Figura V-14. Curvas de crecimiento de *B. thermosphacta* en carne de pollo envasada en MAP y con diferentes concentraciones de P-24FR

Tabla V-8. Parámetros de los modelos crecimiento de *Brochothrix thermosphacta* en carne de pollo en MAP, con diferentes concentraciones de P-24FR

Conc. (g/kg)	Y_0 (log ufc·g ⁻¹)	Y_f (log ufc·g ⁻¹)	λ (d)	μ_{max} (log ufc·g ⁻¹ ·d ⁻¹)	SE	R ²
0*	2,85±0,22	5,41±0,17	-	0,59±0,1	0,333	0,907
20*	2,39±0,14	4,32±1,23	-	0,19±0,04	0,235	0,879
30**	2,64±0,11	-	-	0,003±0,02	0,199	0,003

*Modelo de Baranyi y Roberts, **Modelo Lineal

En MAP al aplicar 20 g/kg de bioconservante, los recuentos finales se redujeron en ~1,5 log ufc/g, con respecto al control, mientras que con 30 g/kg se obtuvo una inhibición total del microorganismo dado que la velocidad de crecimiento fue prácticamente nula (Tabla V-8). Este fenómeno no se observó en la carne con la misma concentración de P-24FR sin MAP (Figura V-5), de modo que el bioconservante P-24FR y la atmósfera modificada ejercen un efecto sinérgico en la extensión de la vida útil del producto.

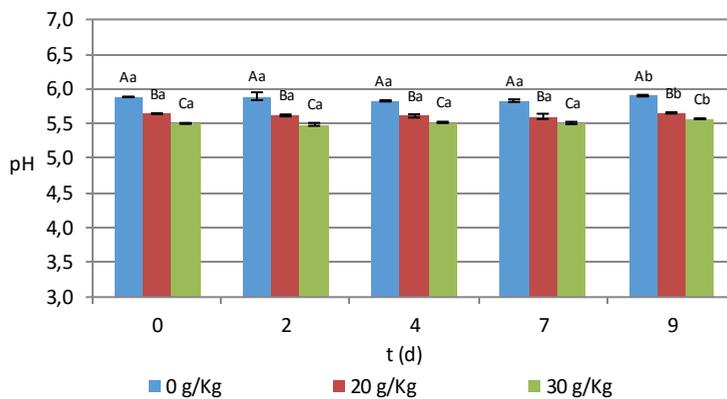
La composición de la atmósfera define el tipo de metabolismo (aeróbico o anaeróbico) de *B. thermosphacta*, del cual dependen los productos metabólicos que genera, siendo algunos de ellos responsables de aromas desagradables en la carne (Blickstad, 1983). En general se prefiere el metabolismo anaeróbico, debido a que en este caso se produce ácido láctico y etanol, principalmente, mientras que en el metabolismo aeróbico se producen compuestos indeseables como acetoina y los ácidos acético, isobutírico e isovalérico, entre otros compuestos (Pin et al., 2002).

Al igual que en las determinaciones microbiológicas realizadas a la carne de pollo picada, los recuentos de enterobacterias fueron inferiores a 10 ufc/g (resultados no mostrados).

V.4.2.2 Determinaciones fisicoquímicas

V.4.2.3 Efecto sobre el pH

Los valores de pH fueron significativamente más bajos ($p < 0,001$, $F = 954,07$) cuando se utilizó P-24FR en comparación con la muestra control (Figura V-15). A pesar de que con 20 y 30 g/kg se obtuvieron diferencias significativas, los valores de pH a cada tiempo difirieron sólo en 0,1 unidades aproximadamente.



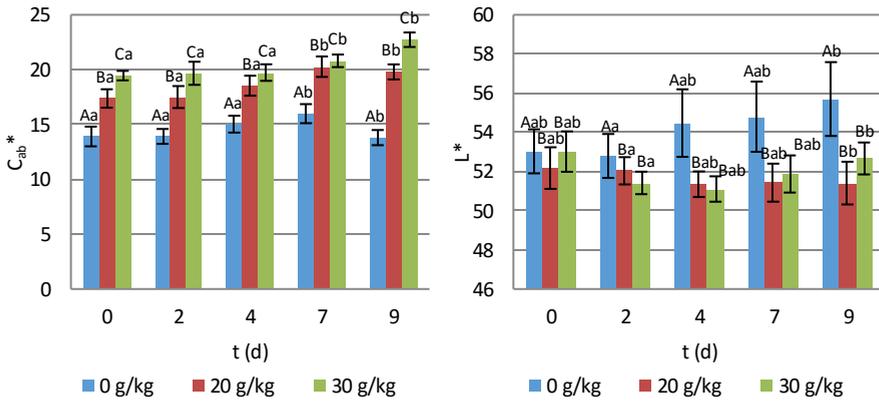
*Letra diferente indica diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test de Tukey en el ANOVA multifactorial. Mayúscula: factor Concentración. Minúscula: factor tiempo.

Figura V-15. Variación del pH de la carne de pollo en MAP tratada con diferentes concentraciones de P-24FR

Los valores del pH se mantuvieron prácticamente constantes en el tiempo a diferencia de lo observado con la carne de pollo sin MAP, para la cual se detectó una reducción del pH en el tiempo con 20 y 30 g/kg de P-24FR, de 0,7 y 0,4 unidades de pH respectivamente (Figura V-6). Esto puede deberse a que con MAP se consiguió inhibir a microorganismos alterantes productores de ácidos orgánicos, como las bacterias ácido-lácticas y *B. thermosphacta*. Asimismo, no se produjo un aumento del pH en el caso de la muestra Control.

V.4.2.4 Propiedades ópticas

Al igual que en el caso del pollo picado (apartado V.4.1.2.3) la coloración del bioconservante y el descenso de pH serían los principales causantes del aumento del croma (C_{ab}^*) de las muestras en función de la concentración utilizada ($p < 0,001$, $F=248,58$) (Figura V-16). En el transcurso del almacenamiento, se observó un aumento de C_{ab}^* ($p < 0,001$, $F=15,11$) como en el caso de la carne de pollo picada. Se obtuvo además una interacción significativa de ambos factores ($p < 0,001$, $F=4,43$), aunque las variaciones de croma en el tiempo realmente no fueron tan importantes entre las dosis durante los primeros siete días.



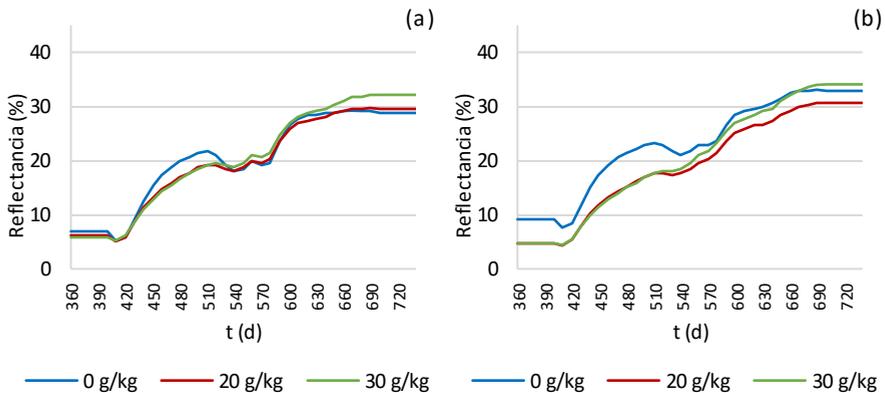
*Letra diferente indica diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test de Tukey en el ANOVA multifactorial. Mayúscula: factor Concentración. Minúscula: factor tiempo.

Figura V-16. Croma (C_{ab}^*) y luminosidad (L^*) y durante el almacenamiento de la carne de pollo tratada con diferentes concentraciones de P-24FR

La luminosidad, por su parte fue significativamente mayor ($p < 0,001$, $F=45,14$) en la muestra control que cuando se utilizó el bioconservante, por lo cual puede considerarse que la carne adquiriría un color más pálido o grisáceo, fenómeno que puede ocurrir en la carne de pollo picada envasada en MAP (Saucier et al., 2000). No se produjeron diferencias en este parámetro entre las dos concentraciones de P-24FR utilizadas. Por su parte, el

tiempo presentó un leve efecto significativo ($p=0,0193$, $F=4,26$) sobre L^* , siendo mucho más relevante el efecto de la concentración.

En la Figura V-17 se observa la modificación de los espectros según la concentración y el tiempo de almacenamiento (0 y 9 días). Para $t = 0$ d, existen cambios importantes en la absorbancia en la región de los azules y verdes (420 – 540 nm), siendo menores las reflectancias en el caso de las muestras con bioconservante. A su vez, las reflectancias de la zona de los rojos (660 – 720 nm) son mayores en estas muestras, probablemente debido a la adición del bioconservante, como se comentó anteriormente en el caso de la carne de pollo picada. Para $t = 9$ d, se intensifican los cambios en la región de 420 – 540 nm y en general, se presentan cambios en todo el espectro que denotan la evolución del color en la carne de pollo con las dos concentraciones de P-24FR.

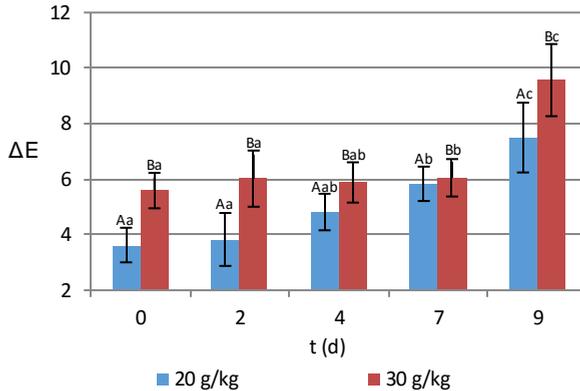


*Letra diferente indica diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test de Tukey en el ANOVA multifactorial. Mayúscula: factor Concentración. Minúscula: factor tiempo.

Figura V-17. Espectros de reflectancia (%) de la carne de pollo en MAP con diferentes concentraciones de P-24FR para $t = 0$ d (a) y $t = 9$ d (b)

Las diferencias entre los espectros de la muestra control y los de las muestras con P-24FR se traducen en las diferencias de color (ΔE), que se muestran en la Figura V-18. Se observaron diferencias significativas ($p < 0,001$, $F=72,23$) entre aplicar 20 o 30 g/kg del bioconservante, y un aumento significativo ($p < 0,001$, $F=63,23$) de ΔE en el tiempo,

especialmente al noveno día de almacenamiento. Dado que la velocidad en la que cambia el valor de ΔE cuando se utiliza 20 g/kg es más alta que con 30 g/kg, se produjo una interacción significativa entre los dos factores ($p < 0,01$, $F = 4,57$).



*Letra diferente indica diferencias significativas ($p < 0,05$) según el test de Tukey en el ANOVA multifactorial. Mayúscula: factor Concentración. Minúscula: factor tiempo.

Figura V-18. Diferencias en Color (ΔE) de la carne de pollo en MAP tratada con bioconservante (20 y 30 g/kg) y comparadas con la muestra control (0 g/kg)

V.4.2.5 Concentración de gases en el envase

No se observaron cambios en la atmósfera modificada durante los nueve días de estudio, manteniéndose su composición inicial (22% O_2 , 30% CO_2 , y 48% N_2), probablemente debido a que el tiempo de almacenamiento no fue lo suficientemente largo para permitir el desarrollo de microorganismos capaces de alterar la concentración de los gases mediante el consumo de oxígeno o la producción de CO_2 . La concentración de este último en la carne en MAP también depende de la cantidad que pueda ser absorbida por el producto en las condiciones de envasado (Esmer et al., 2011).

V.5 CONCLUSIONES

En este capítulo se evidenció la capacidad antimicrobiana del bioconservante en polvo obtenido a partir de un cultivo iniciador de *Pediococcus pentosaceus* sobre carne de pollo

picada durante el almacenamiento en refrigeración. A concentraciones entre 30 y 60 g/kg se observó una inhibición del crecimiento de aerobios mesófilos y pseudomonas durante los primeros días. Concentraciones de 50 y 60 g/kg inhibieron totalmente el desarrollo de *B. thermosphacta*, mientras que con 10 y 20 g/kg apenas se observó efecto antimicrobiano. Por otra parte, las propiedades fisicoquímicas tales como el color y la pérdida de agua por goteo se ven tanto más afectadas cuanto mayor es la concentración de bioconservante utilizada.

Al aplicar la bioconservación en conjunto con el envasado en atmósfera modificada (MAP), se produce un efecto sinérgico, dado que la reducción de los recuentos es considerablemente mejor al compararla con la carne de pollo sin MAP. Además, la utilización de MAP reduce también las alteraciones en las propiedades fisicoquímicas de la carne en comparación con las muestras no envasadas en MAP. Por lo tanto, una concentración de bioconservante de 20 g/kg combinada con una atmósfera modificada con una mezcla de gases de 22% O₂, 30% CO₂, y 48% N₂ permitiría alargar la vida útil de la carne de pollo picada en refrigeración más allá de los nueve días, inhibiendo el desarrollo de pseudomonas y *B. thermosphacta*, microorganismos normalmente implicados en la aparición de olores desagradables. Además, al reducirse el desarrollo de BAL se evitaría la aparición de alteraciones relacionadas con su crecimiento.

Los resultados de este estudio demuestran que el bioconservante P-24FR podría ser utilizado en productos de carne de pollo, siempre que se establezcan las dosis adecuadas en función de la vida útil deseada y de otras variables, como el tipo de producto y los ingredientes que lo integran. De este modo, de cara a la aplicación de P-24FR en productos cárnicos, se deberá considerar que el efecto sobre la flora microbiana y las propiedades fisicoquímicas sería distinto al obtenido en este estudio si se contemplan variaciones en la composición de la atmósfera del envase (otra mezcla de gases o vacío), el uso de otras técnicas de conservación (como la aplicación de tratamientos térmicos o el uso de altas presiones hidrostáticas) y la adición de otros ingredientes antimicrobianos como la sal o las especias.

V.6 REFERENCIAS

- Allen, C. D., Russell, S. M., & Fletcher, D. L. (1997). The relationship of broiler breast meat color and pH to shelf-life and odor development. *Poultry science*, 76(1993), 1042-1046.
- Alvarado, C., & McKee, S. (2007). Marination to improve functional properties and safety of poultry meat. *Journal of Applied Poultry Research*, 16(1), 113-120.
- Baranyi, J., & Roberts, T. (1994). A dynamic approach to predict bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277-294.
- Bigelow, W., & Esty, J. (1920). The thermal death point in relation to time of typical thermophilic organisms. *Journal of infectious diseases*, 27(6), 602-617.
- Blickstad, E. (1983). Growth and end product formation of 2 psychrotrophic *Lactobacillus* spp. and *Brochothrix thermosphacta* ATCC-11509T at different pH values and temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(6), 1345-1350.
- Bolton, D. J., Meredith, H., Walsh, D., & McDowell, D. a. (2014). The effect of chemical treatments in laboratory and broiler plant studies on the microbial status and shelf-life of poultry. *Food Control*, 36(1), 230-237.
- Borch, E., Kant-Muermans, M., & Blixt, Y. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International journal of food microbiology*, 33, 103-120.
- Cálix-Lara, T., Rajendran, M., Talcott, S., Stephen, B., Miller, R., Castillo, A., ... Taylor, T. (2014). Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on spinach and identification of antimicrobial substances produced by a commercial Lactic Acid Bacteria food safety intervention. *Food microbiology*, 38, 192-200.
- Casaburi, A., De Filippis, F., Villani, F., & Ercolini, D. (2014). Activities of strains of *Brochothrix thermosphacta* in vitro and in meat. *Food Research International*, 62, 366-374.
- Casaburi, A., Piombino, P., Nychas, G.-J., Villani, F., & Ercolini, D. (2015). Bacterial populations and the volatileome associated to meat spoilage. *Food Microbiology*, 45(Part A), 83-102.
- Cayré, M. E., Garro, O., & 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. *Food Microbiology*, 22(6), 505-512.
- CE. (2007). Reglamento (CE) N° 1441/2007 de la comisión de 5 de diciembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) N° 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Diario Oficial de Unión Europea*, 322(3), 12-29.
- Cervený, J., Meyer, J. D., & Hall, P. A. (2010). Microbiological spoilage of meat and poultry products. En W. H. Sperber & M. P. Doyle (Eds.), *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages* (pp. 69–86). Springer Science & Business Media.
- Chenoll, E., Macián, M. C., Elizaquível, P., & Aznar, R. (2007). Lactic acid bacteria associated with vacuum-packed cooked meat products spoilage: population analysis by rDNA-based methods. *Journal of applied microbiology*, 102(2), 498-508.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., & Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International journal of food microbiology*, 71(1), 1-20.
- Cortez-Vega, W. R., Pizato, S., & Prentice, C. (2012). Quality of raw chicken breast stored at 5°C and packaged under different modified atmospheres. *Journal of Food Safety*, 32(3), 360-368.
- Doulgeraki, A. I., Ercolini, D., Villani, F., & Nychas, G.-J. E. (2012). Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International journal of food microbiology*, 157(2), 130-41.
- Doulgeraki, A. I., Paramithiotis, S., Kagkli, D. M., & Nychas, G.-J. E. (2010). Lactic acid bacteria population dynamics during minced beef storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *Food microbiology*, 27(8), 1028-34.
- Doyle, M. P., & Beuchart, L. R. (2007). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (3rd edición). Washington: ASM Press.
- Esmer, O., Irkin, R., Degirmencioglu, N., & Degirmencioglu, A. (2011). The effects of modified atmosphere gas composition on microbiological criteria, color and oxidation values of minced beef meat. *Meat science*, 88, 221-226.
- Fletcher, D. L. (1999). Broiler breast meat color variation, pH, and Texture. *Poultry Science*, 78(9), 1323-1327.
- Geeraerd, A. H., Herremans, C. H., & Van Impe, J. F. (2000). Structural model requirements to

- describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International journal of food microbiology*, 59(3), 185-209.
- Geeraerd, A., Valdramidis, V., & Impe, J. Van. (2005). GInaFIT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 95-105.
- Gill, C. O., & Newton, K. G. (1982). Effect of lactic acid concentration on growth on meat of Gram-negative psychrotrophs from a meatworks. *Applied and environmental microbiology*, 43(2), 284-8.
- Gram, L. (1993). Inhibitory effect against pathogenic and spoilage bacteria of *Pseudomonas* strains isolated from spoiled and fresh fish. Inhibitory Effect against Pathogenic and Spoilage Bacteria of *Pseudomonas* Strains Isolated from Spoiled and Fresh Fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(7), 2197-2203.
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bartholin, B., Christensen, A., & Givskov, M. (2002). Food spoilage — interactions between food spoilage bacteria. *International journal of food microbiology*, 78, 79-97.
- Honikel, K.-O. (1998). Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Science*, 49(4), 447-457.
- Hugas, M. (1998). Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat science*, 49S1(98), S139-50.
- Hughes, J. M., Oiseth, S. K., Purslow, P. P., & Warner, R. D. (2014). A structural approach to understanding the interactions between colour, water-holding capacity and tenderness. *Meat Science*, 98(3), 520-532.
- Hutkins, R. W., & Nannen, N. L. (1993). pH Homeostasis in Lactic Acid Bacteria. *Journal of dairy science*, 76(8), 2354-2365.
- ISO 15214:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria. Colony-count technique at 30 degrees C (1998). International Organization for Standardization (ISO).
- Katikou, P., Ambrosiadis, I., Georgantelis, D., Koidis, P., & Georgakis, S. a. (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 beef. *Journal of applied microbiology*, 99(6), 1303-13.
- Knox, B. L., van Laack, R. L. J. M., & Davidson, P. M. (2008). Relationships between ultimate pH and microbial, chemical, and physical characteristics of vacuum-packaged pork loins. *Journal of food science*, 73(3), M104-10.
- Koutsoumanis, K., Stamatiou, A. P., Drosinos, E. H., & Nychas, G. J. E. (2008). Control of spoilage microorganisms in minced pork by a self-developed modified atmosphere induced by the respiratory activity of meat microflora. *Food Microbiology*, 25(7), 915-921.
- Labadie, J. (1999). Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. *Meat Science*, 52(3), 299-305.
- Langston, S. W., Altman, N. S., & Hotchkiss, J. H. (1993). Within and between sample comparisons of Gompertz parameters for Salmonella enteritidis and aerobic plate counts in chicken stored in air and modified atmosphere. *Int J Food Microbiol*, 18(1), 43-52.
- Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International journal of food microbiology*, 55(1-3), 181-186.
- Lin, M., Al-Holy, M., Mousavi-Hesary, M., Al-Qadiri, H., Cavinato, A. G., & Rasco, B. A. (2004). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage in chicken meat by diffuse reflectance spectroscopy (600-1100 nm). *Letters in Applied Microbiology*, 39(2), 148-155.
- Lücke, F.-K. (2000). Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat science*, 56(2), 105-115.
- Mastromatteo, M., Lucera, A., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2009). Microbiological characteristics of poultry patties in relation to packaging atmospheres. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(12), 2620-2628.
- McAuliffe, O., & Jordan, K. N. (2012). Biotechnological Approaches for Control of *Listeria monocytogenes* in Foods. *Current Biotechnology*, 1(4), 267-280.
- Nassos, P. S., King, A. D., & Stafford, A. E. (1983). Relationship between lactic acid concentration and bacterial spoilage in ground beef. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(4), 894-900.
- Papadopoulou, O. S., Doulgeraki, A. I., Botta, C., Coccolin, L., & Nychas, G.-J. E. (2012). Genotypic characterization of *Brochothrix thermosphacta* isolated during storage of minced pork under

- aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *Meat science*, 92(4), 735-8.
- Parada, J., Ricoy Caron, C., Medeiros, A. B. P., & Soccol, C. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(3), 521-542.
- Pin, C., García de Fernando, G. D., & Ordóñez, J. A. (2002). Effect of modified atmosphere composition on the metabolism of glucose by *Brochothrix thermosphacta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4441-4447.
- Qiao, M., Fletcher, L., Northcutt, J. K., & Smith, D. P. (2002). The relationship between raw broiler breast meat colour and composition. *Poultry Science*, 81, 422-427.
- Reis, J. a., Paula, a. T., Casarotti, S. N., & Penna, a. L. B. (2012). Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Engineering Reviews*, 4(2), 124-140.
- Russo, F., Ercolini, D., Mauriello, G., & Villani, F. (2006). Behaviour of *Brochothrix thermosphacta* in presence of other meat spoilage microbial groups. *Food microbiology*, 79, 2006.
- Saucier, L., Gendron, C., & Gariépy, C. (2000). Shelf life of ground poultry meat stored under modified atmosphere. *Poultry science*, 79, 1851-1856.
- Shin, J., Harte, B., Ryser, E., & Selke, S. (2010). Active Packaging of Fresh Chicken Breast, with Allyl Isothiocyanate (AITC) in Combination with Modified Atmosphere Packaging (MAP) to Control the Growth of Pathogens. *Journal of Food Science*, 75(2), 65-71.
- UNE 34-557-83: Carnes y productos cárnicos. Investigación y recuento de Enterobacteriaceae. (1983). AENOR.
- UNE-EN ISO 4833-1:2013. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Parte 1: Recuento de colonias a 30°C mediante la técnica de siembra en profundidad. (2014). AENOR.

CONSIDERACIONES FINALES Y RECOMENDACIONES

VI. CONSIDERACIONES FINALES Y RECOMENDACIONES

Los resultados de esta tesis demuestran la posibilidad tecnológica de elaborar bioconservantes a partir de los cultivos iniciadores *L. plantarum* y *P. pentosaceus* pertenecientes a la colección de la empresa colaboradora de este proyecto. Tal como se ha demostrado en este trabajo, ambos microorganismos son capaces de producir metabolitos antimicrobianos con efecto antagónico sobre microorganismos patógenos (*E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*) y sobre bacterias alterantes de la carne de cerdo y pollo (enterobacterias, bacterias ácido-lácticas, *Brochothrix thermosphacta* y pseudomonas).

El poder antimicrobiano de los caldos de fermentación de las cepas estudiadas se atribuye a la producción de ácido láctico. Considerando que al neutralizar dichos caldos desaparecía completamente el efecto antimicrobiano, se infiere que a las condiciones ensayadas, ambos microorganismos no son capaces de producir (o no lo hacen en cantidades detectables) otras sustancias antimicrobianas, como las bacteriocinas. Como se ha comentado en esta tesis, la producción de estos compuestos depende de una variedad de factores, como la temperatura de incubación o la composición del medio. Por ello, se debe estudiar si estos microorganismos pueden producir bacteriocinas al modificar alguna(s) de las condiciones del proceso de fermentación. La presencia de bacteriocinas (u otros péptidos antimicrobianos) en el producto bioconservante reforzaría la actividad antimicrobiana del mismo, al aplicar otras sustancias antimicrobianas distintas al ácido láctico, pudiendo incluso producirse en efecto sinérgico.

Dado que el efecto antimicrobiano de los productos bioconservantes obtenidos en este proyecto depende únicamente de los ácidos, las dosis y el tipo de producto cárnico al cual pueden aplicarse se encuentran limitados, considerando que a determinadas concentraciones generan cambios indeseables en el color y la capacidad de retención de agua. Por esta razón debe establecerse una dosis recomendada, que dependerá de las características del producto cárnico y de la vida útil que se desee conseguir en el mismo.

El crecimiento microbiano depende del envasado (aire, vacío o MAP), el formato (picada, troceada, embutida), tratamientos previos (cocción, altas presiones hidrostáticas, entre otros) y la presencia de ingredientes con poder antimicrobiano (especias, fosfatos, sal, entre otros). Sobre estos últimos, las tendencias en alimentación de productos libres de conservantes, impulsan a la industria cárnica a eliminarlos en la medida de lo posible, lo cual puede conseguirse sustituyéndolos por bioconservantes como los elaborados en este proyecto. Sin embargo, debe determinarse el impacto a nivel sensorial en el producto cárnico, ya que podrían producir modificaciones en el sabor, color o textura que limitarían su aplicación a productos específicos. En este sentido, aún deben esclarecerse las posibilidades comerciales de ambos bioconservantes, considerando el tipo de producto cárnico al cual podrían aplicarse (productos adobados, marinados, cocidos, etc.), las dosis necesarias para lograr un efecto inhibitorio aceptable y la repercusión que tendrá en el precio del producto para el distribuidor y el consumidor final. Todo ello depende de la rentabilidad económica del proceso de obtención y purificación. Será más rentable si se plantea que del mismo proceso de fermentación se obtenga por una parte, la biomasa para la producción de starters, y por otra, el caldo de fermentación para la elaboración de bioconservantes. En investigaciones futuras deberá considerarse esta visión del proceso. Por esta razón, si se realizan modificaciones en la composición del medio y/o en las condiciones de fermentación para aumentar la producción de sustancias antimicrobianas, dichos cambios deberían considerar la producción de biomasa.

Para la aplicación de los bioconservantes obtenidos en este trabajo, deberá realizarse una sustitución de los componentes del medio de cultivo MRS por sus equivalentes de uso alimentario. Aunque algunos de dichos componentes no se encuentran autorizados específicamente para su aplicación en productos cárnicos (según los Reglamentos (CE) 1333/2008 y 1129/2011), existen mecanismos para solicitar su autorización que deberán contemplarse de cara a la comercialización del bioconservante, como lo establece el Reglamento (CE) 258/97 y atendiendo al texto de recomendaciones de la comisión del 29 de julio de 1997, relativo a dicho reglamento.

Más allá de los resultados obtenidos, en el desarrollo de este trabajo se ha establecido una metodología y un conjunto de técnicas analíticas que pueden ser aplicadas en el estudio de otras cepas bacterianas con el objetivo de producir bioconservantes. En el caso de la empresa colaboradora, este proyecto de tesis ha sentado las bases de una nueva línea de investigación y desarrollo de ingredientes bioconservantes, lo cual contribuye a que en el futuro pueda ampliarse su oferta de productos hacia opciones innovadoras, acordes a las demandas del consumidor y en línea con las tendencias actuales en ingredientes alimentarios.