



COORDINACION DE SERVICIOS  
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

---

---

**EMPLEO DE CULTIVOS BIOPROTECTORES Y  
NISINA SOBRE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y  
FISICOQUÍMICA DE CARNE DE POLLO  
ALMACENADA EN CONDICIONES DE ABUSO DE  
TEMPERATURA**

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA  
BACILIZA QUINTERO SALAZAR**

MÉXICO, DISTRITO FEDERAL

OCTUBRE DEL 2001

Maestría en Biotecnología esta incluida en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio **471-0/ Maestría en Biotecnología**".

---



El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la de la unidad Iztapalapa aprobó la comunicación de resultados que presentó:

**BACILIZA QUINTERO SALAZAR**

El día 3 del mes de octubre del 2001

Comité tutorial:

Directora: Dra. Edith Ponce Alquicira  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesora: Dra. Isabel Guerrero Legarreta  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesora: Dra Ma. de Lourdes Pérez Chabela  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Sinodal: Dra. Amelia Farrés González-Saravia  
Universidad Nacional Autónoma de México

Sinodal: Dr. Carlos Regalado González  
Universidad Autónoma de Querétaro

IT= 692/02

---

# AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A todos y cada uno de los mexicanos, quienes en su mayoría, sin imaginárselo siquiera, financiaron mis estudios de Maestría en Biotecnología a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por medio del proyecto J-28670-B: “Efecto del Metabolismo de las Bacterias Lácticas sobre la Calidad de Pollo y Pescado”.

A la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, por haberme brindado la oportunidad de alcanzar dentro de sus aulas uno de mis más grandes sueños.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme todas las herramientas necesarias para realizar con éxito estos estudios de posgrado.

A las doctoras Isabel Guerrero y Lourdes Pérez, por la ayuda recibida en la revisión de este manuscrito, y por ayudarme a resolver mis dudas cuando lo necesité.

A la Doctora Amelia Farrés, por sus valiosas sugerencias para darle un mejor enfoque a esta tesis. Pero además, porque sus clases de Biotecnología en la UNAM fueron el factor decisivo que despertó en mí el interés por conocer más a cerca de ésta área, lo cual finalmente me llevó a realizar estos estudios de posgrado.

Al Doctor Carlos Regalado y a la M. en C. Blanca García, por la revisión crítica y por sus valiosas sugerencias para mejorar la calidad este manuscrito, pero sobre todo, por mostrarme mis errores y brindarme todos los elementos necesarios para corregirlos.

A mi asesora Edith, por brindarme la oportunidad de trabajar y aprender de ella. Gracias por haber estado siempre pendiente de mí y por haber dedicado el tiempo necesario y más, para resolver mis dudas en todo momento y a todas horas. Pero sobre todo, gracias por confiar en mí, en mi trabajo y por permitirme hacer, decidir y pensar en libertad.

---

---

Al Creador porque de no ser por él no estaría yo aquí.

A mis padres Luisa y Kefrén, por brindarme todo su cariño, comprensión, confianza y apoyo incondicional en todo momento y en todo lugar. Gracias por ser un gran ejemplo digno a seguir, los quiero muchísimo y son mi más grande inspiración.

A mis hermanos Male, Lety y Toño, por todos momentos que hemos vivido y disfrutado juntos, y por todas las cosas valiosas que cada uno de ustedes ha aportado a mi vida.

A Julio, por todos aquellos grandes detalles que, aunque en su momento no los aprecié como hubieras deseado, definitivamente fueron muy importantes para mí. Gracias por tu amistad incondicional que espero permanezca vigente siempre, pero sobre todo gracias por la gran lección que has aportado a mi vida.

A mi prima Edith, quien afortunadamente me hizo reír de lo lindo durante la escritura de esta tesis con sus ocurrencias y su baile de La Iguana y otros tantos.

A mis primos, sobrinos, abuelos y tíos, especialmente a mi abuelita Margarita y a mi tía Elvia.

A mis grandes amigos: Ale, Estelita y Octavio, por su valiosa amistad, y por haberme permitido compartirles mis aciertos y fracasos, así como mis sueños guajiros.

A mis amigos de siempre: América, Gera y Susy, por su amistad incondicional durante todos estos años.

A Joaquín, Gabi, Ana María, a mi compadrito Alejandro y a mis más recientes amigos Santiago y Lucia.

---

---

A Marcelo y Silvia, quienes no dudaron en escucharme y regalarme su valioso tiempo para resolver mis dudas durante la elaboración de esta tesis, asimismo por su ayuda en la determinación de aminas biogénicas.

A todos mis compañeros y profesores de la Maestría en Biotecnología generación 1998-2000.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio del Área de Macromoléculas: Raquelita, Yoyi, Rosa, Conny, Cuahutemoc, Ernesto, Hugo, Keyko, Luis, Ruth y Sandy.

A mis entrañables amigos de la Escuelita: Andrés, Edgar, Gina, Hugo, Misael, Pina, Tere y Yadis, por los todos los momentos gloriosos vividos en la Facultad de Química y fuera de ella.

A todos ellos mi más grande reconocimiento

*Baciliza*

---

---

---

*Hay hombres que luchan un día y son buenos,  
Hay otros que luchan un año y son mejores,  
Hay quienes luchan muchos años, y son muy buenos,  
Pero hay los que luchan toda la vida, éstos son los imprescindibles.*

*Bertol Bresh*

---

---

---

# ***RESUMEN***

---

*Empleo de cultivos bioprotectores y nisina sobre la calidad microbiológica y fisicoquímica de carne de pollo almacenada en condiciones de abuso de temperatura*

---

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del empleo de cultivos bioprotectores y nisina sobre las características microbiológicas y fisicoquímicas de la carne de pollo empacada al vacío y almacenada a  $10^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 8 días.

En primer término, porciones de músculo *Pectoralis* de pollo se inocularon por inmersión en una suspensión celular de un cultivo bioprotector ( $10^8$  ufc/mL de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* ATCC 11454 o *Staphylococcus carnosus* MC-1-02055) o nisina (12.5mg/L) adicionado con una cepa de un cultivo indicador ( $10^8$  ufc/mL de *Escherichia coli* ATCC 8937,  $10^9$  ufc/mL de *Pseudomonas fluorescens* C65 o  $10^8$  ufc/mL de *Listeria innocua* ATCC 33090) y 2.5 o 5% de sacarosa. Los controles se prepararon sin la adición de cultivos bioprotectores y nisina. Posteriormente, las muestras se empacaron al vacío y se almacenaron a  $10^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ , por 8 días, durante los cuales, se enumeraron las poblaciones de pseudomonas, coliformes totales o *Listeria*. Asimismo, se evaluó la producción de aminas biogénicas en muestras con tratadas con cultivos bioprotectores y microorganismos indicadores (*P. fluorescens* o *E. coli*). En segundo término, se evaluó el efecto del empleo de cultivos bioprotectores o nisina sobre las características fisicoquímicas, así como la producción de aminas biogénicas en la carne inoculada únicamente con cultivos bioprotectores o nisina.

Se encontró que el empleo de cultivos bioprotectores *L. lactis* o *S. carnosus* retardaron significativamente ( $P>0.0001$ ) el crecimiento de microorganismos indicadores. Cuando la concentración de sacarosa adicionada a los inóculos fue de 5%, las poblaciones promedio de pseudomonas fueron reducidas en 2 y 3 log ufc/cm<sup>2</sup>, coliformes totales en log 1.5 y 1.25 ufc/cm<sup>2</sup> y *Listeria* en 3 y 0.5 log ufc/cm<sup>2</sup>, para las muestras inoculadas con *L. lactis* o *S. carnosus*, respectivamente. Cuando la adición de sacarosa a los inóculos fue de 2.5%, la reducción en la población de microorganismos indicadores fue menos evidente que con 5%. Por otra parte, la bacteriocina nisina se empleó únicamente en las muestras adicionadas con 2.5% de sacarosa y sólo provocó una reducción significativa ( $P>0.0001$ ) en la población de *Listeria*.

El empleo de cultivos bioprotectores y nisina disminuyó significativamente ( $P > 0.0001$ ) la producción de cadaverina y putrescina, en las muestras inoculadas en presencia de microorganismos indicadores.

Los resultados de los análisis fisicoquímicos muestran que los cultivos bioprotectores redujeron significativamente el pH ( $P > 0.0001$ ) y la capacidad de retención de agua, especialmente en aquellas muestras inoculadas con *L. lactis*. En relación con la textura, los valores de esfuerzo al corte mostraron una disminución significativa ( $P > 0.0001$ ) durante los primeros 4 días de almacenamiento, sin embargo, pero un incremento significativo ( $P > 0.0001$ ) a los 8 días, especialmente en las muestras tratadas con *L. lactis*, independientemente de la concentración de sacarosa adicionada a los inóculos. Con respecto a integridad de las proteínas miofibrilares, después de 8 días de almacenamiento se observó degradación de la miosina pero no de la actina.

Respecto al color, las muestras inoculadas con cultivos bioprotectores disminuyeron de manera significativa ( $P > 0.0001$ ) la luminosidad y la cromaticidad. Asimismo presentaron valores significativamente mayores ( $P > 0.0001$ ) en la diferencia total de color ( $\Delta E$ ).

Es posible concluir que la inoculación de carne de pollo con cultivos bioprotectores o nisina incrementa la calidad microbiológica y retarda la producción de aminas biogénicas. Sin embargo, las características fisicoquímicas, como son la capacidad de retención de agua, textura y color pueden verse afectadas si se incrementa la concentración de sacarosa adicionada al inóculo.

---

# ***ABSTRACT***

---

*Empleo de cultivos bioprotectores y nisina sobre la calidad microbiológica y fisicoquímica de carne de pollo almacenada en condiciones de abuso de temperatura*

---

The main objective of this work was to evaluate the effect of bioprotective cultures or nisin on the microbial and physicochemical qualities of vacuum packaged chicken meat stored at  $10^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  during 8 days.

First, portions of chicken breast were inoculated by immersion in a cell suspension of bioprotector culture ( $10^8$ cfu/mL of *Lactococcus lactis* subs. *lactis* ATCC 11454 or *Staphylococcus carnosus* MC-1-02055) or nisin (12.5 mg/L) added with an indicator strain ( $10^8$ cfu/mL of *Escherichia coli* ATCC 8937,  $10^9$ cfu/mL of *Pseudomonas fluorescens* C65 or  $10^8$ cfu/mL of *Listeria innocua* ATCC 33090) respectively, and 2.5 or 5% of sucrose. Controls were prepared as before but without addition of bioprotective cultures. Samples were vacuum packaged and stored at  $10^{\circ}\text{C}$  for 8 days, and analyzed for pseudomonads, total coliform or *Listeria* populations. Afterwards, biogenic amine formation was evaluated for samples inoculated with bioprotective cultures or nisin mixed with *P. fluorescens* or *E. coli*. Finally, changes on the physicochemical qualities and amines production were evaluated in samples inoculated only with bioprotective cultures or nisin.

As expected, both bioprotective cultures *L. lactis* and *S. carnosus* reduced ( $P>0.0001$ ) the population of indicators. When 5% of sucrose was added, Pseudomonadas populations were reduced in 2 and 3 log cfu/cm<sup>2</sup>, while total coliforms populations were reduced in 1.5 cfu/cm<sup>2</sup> and 1.25 cycles, and *Listeria* in 3 and 0.5 cfu/cm<sup>2</sup> respectively. The addition of sucrose 2.5 % resulted in a lower inhibition of microorganisms indicators. Samples treated with nisin showed reduction only in *Listeria* population when 2.5% of sucrose was added.

Bioprotective cultures retarded cadaverine and putrescine production in samples inoculated with and without indicators. Chicken meat added with 2.5% of sucrose inoculated with indicators (*P. fluorescens* or *E. coli*) and bioprotective cultures or nisin produced putrescine and cadaverine levels significantly lower ( $P>0.0001$ ) than the control samples.

Results demonstrated that the presence of bioprotective cultures promoted a reduction ( $P>0.0001$ ) in pH, and water holding capacity, especially in samples inoculated with *L. lactis*. In relation to texture, shear stress was reduced during the first 4 days of storage. Samples inoculated with nisin showed similar behavior to control samples. SDS-PAGE of miofibrillar proteins showed degradation of miosin chain in all samples, although it was more evident after day 8 of storage, especially in samples inoculated with *L. lactis*. Actin did not show signs of degradation.

Bioprotective cultures also produced lightness and chroma values significantly lower ( $P>0.001$ ) than the control, as well as higher values of  $\Delta E$ , especially in samples inoculated with *L. lactis*. Samples treated with nisin had similar behavior values than control.

It is possible to conclude that meat poultry inoculation with bioprotective cultures or nisin increase microbial qualities and decreased biogenic amines production, however addition of bioprotective cultures may affect a physicochemical characteristics of meat like water holding capacity, texture and color, according to the percentage of carbohydrate added.

**(Key words:** bioprotective cultures, biogenic amines, lactic acid bacteria, nisin, poultry, spoilage and pathogenic flora. )

# ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS .....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. JUSTIFICACIÓN.....	4
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1 Importancia del pollo en la alimentación humana.....	7
3.1.1. Producción de aves.....	8
3.2. Parámetros de calidad de la carne.....	10
3.3.1 pH.....	10
3.3.2 Capacidad de retención de agua.....	10
3.3.3 Color.....	11
3.3.4 Textura.....	11
3.3.4.1. Proteínas de la carne y su importancia en las propiedades funcionales.....	12
3.3.4.2. Proteínas miofibrilares.....	12
3.3.4.3. Proteínas sarcoplásmicas.....	14
3.3.4.4. Proteínas del estroma.....	14
3.3. Origen, tipo, e importancia de los microorganismos presentes en la carne de pollo.....	15
3.3.1. Microorganismos causantes de deterioro.....	15
3.3.1.1. <i>Pseudomonas</i> .....	16
3.3.1.2. <i>Brochotrix thermosphacta</i> .....	17
3.3.1.3. Origen de los microorganismos causantes de deterioro.....	17
3.3.2. Microorganismos patógenos.....	18
3.3.2.1. <i>Salmonella</i> .....	18
3.3.2.2. <i>Campylobacter</i> .....	19
3.3.2.3. <i>Listeria</i> .....	19
3.3.2.4. <i>Escherichia coli</i> .....	19
3.3.2.5. Importancia de la carne de aves como vehículo causante de toxiinfecciones e intoxicaciones alimentarias.....	20
3.3.2.6. Factores que contribuyen al aumento de las enfermedades ocasionadas por alimentos.....	22
3.4 Factores que contribuyen al crecimiento de microorganismos en la carne de pollo.....	24
3.4.1 Factores intrínsecos.....	24
3.4.1.1 Composición química.....	24
3.4.1.2 pH.....	25
3.4.1.3 Actividad de agua.....	26
3.4.1.4 Potencial oxido-reducción.....	27
3.4.2 Factores extrínsecos.....	27
3.4.2.1. Temperatura de conservación.....	27
3.4.2.1. Presencia y concentración de gases en el ambiente.....	28

3.5.	Importancia de las aminas biogénicas como compuestos generados durante el deterioro de la carne .....	30
3.5.1	Definición.....	31
3.5.2	Funciones e importancia.....	31
3.5.3	Microorganismos productores.....	32
3.5.4	Factores que afectan la actividad aminodescarboxilasa.....	32
3.5.5	Toxicidad de las aminas biogénicas.....	32
3.5.6	Aminas biogénicas en productos fermentados.....	33
3.5.7	Aminas biogénicas en carnes no fermentadas.....	33
3.5.8	Putrescina y cadaverina como índices de calidad en la carne fresca.....	34
3.6	Control del deterioro de la carne fresca .....	35
3.6.1	Tratamiento con ácidos orgánicos.....	35
3.6.2	Atmósferas modificadas.....	38
3.6.3	Empacado al vacío.....	38
3.6.4	Bioconservación.....	39
3.6.4.1.	Definición.....	40
3.6.4.2.	Bioconservación y cultivos bioprotectores.....	40
3.6.4.3.	Criterios de selección de cultivos bioprotectores.....	41
3.6.4.4.	Importancia del empleo de cultivos bioprotectores en carne.....	42
3.7	Bacterias lácticas y sus metabolitos.....	43
3.7.1	Clasificación .....	44
3.7.2	Ácidos orgánicos .....	45
3.7.3	Peróxido de hidrógeno .....	46
3.7.4	Diacetilo.....	47
3.7.5	Reuterina.....	47
3.7.6	Bacteriocinas.....	47
3.7.6.1.	Clasificación .....	48
3.7.6.1.	Características y modo de acción.....	49
3.7.6.3.	Nisina.....	51
3.7.6.4.	Aplicación de bacteriocinas en carne y productos cárnicos.....	51
3.7.6.5.	Consideraciones para el empleo de bacteriocinas en alimentos.....	53
4.	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>55</b>
4.1	Objetivo General.....	56
4.2	Objetivos Particulares.....	56
5.	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>57</b>
5.1	Selección de cultivos bioprotectores y nisina.....	59
5.1.1	Ensayo de actividad de bacteriocinas.....	60
5.1.1.1	Preparación del extracto libre de células.....	60
5.1.1.2	Preparación de la cepa sensible.....	61
5.1.1.3	Prueba de producción de bacteriocinas.....	61
5.1.1.4	Sensibilidad frente a proteasas.....	62
5.2	Selección del tipo y concentración de fuente de carbono .....	63
5.2.1	Preparación de cultivos bioprotectores.....	63
5.2.2	Preparación e inoculación del músculo fresco de pollo.....	64
5.2.4	Determinación de pH y acidez total titulable.....	65
5.2.3	Empacado y almacenamiento.....	65
5.3	Efecto del empleo de cultivos bioprotectores o nisina sobre microorganismos indicadores....	66
5.3.1	Preparación de inóculos.....	66
5.3.2	Inoculación del músculo de pollo.....	67
5.3.3	Cuenta de microorganismos .....	67
5.4	Cuantificación de aminas biogénicas.....	69

5.4.1. Extracción y derivatización.....	69
5.4.2. Detección cromatográfica.....	70
5.5. Análisis de los parámetros de calidad.....	70
5.5.1. Preparación de cultivos bioprotectores y nisina.....	71
5.5.2. Inoculación del músculo.....	71
5.5.3. Determinación del pH, acidez total titulable.....	71
5.5.4. Preparación de muestras.....	72
5.5.5. Capacidad de retención de agua.....	72
5.5.6. Cuantificación de ácidos orgánicos.....	72
5.5.6.1. Preparación de muestras.....	72
5.5.7. Textura.....	74
5.5.8. Proteínas miofibrilares.....	74
5.5.9. Determinación de color.....	75
5.6. Análisis estadístico.....	76
<b>6. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>77</b>
6.1 Verificación de la capacidad bacteriogenica de <i>L. lactis</i> .....	78
6.6.1 Sensibilidad a enzimas proteolíticas.....	78
6.2 Selección de la concentración y fuente de carbono.....	79
6.3 Efecto de los cultivos bioprotectores sobre la población de microorganismos indicadores.....	81
6.3.1 Inoculación de la carne con cultivos bioprotectores en presencia de 5% de sacarosa... ..	81
6.3.1.1. Población de pseudomonas.....	81
6.3.1.2. Población de coliformes totales.....	85
6.3.2.3. Población de <i>Listeria</i> .....	88
6.3.2 Biopreservación con inóculos de cultivos bioprotectores o nisina, adicionados con 2.5% de sacarosa.....	90
6.3.2.1. Población de pseudomonas.....	91
6.3.2.2. Población de coliformes totales .....	93
6.3.2.3. Población de <i>Listeria</i> .....	95
6.4 Producción de aminas biogénicas en carne de pollo tratada con cultivos bioprotectores o nisina y 2.5% de sacarosa .....	97
6.4.1 Producción de cadaverina.....	97
6.4.2 Producción de putrescina.....	100
6.4.3 Producción de aminas en muestras tratadas con microorganismos indicadores.....	102
6.4.3.1. Producción de aminas biogénicas en muestras tratadas con <i>E. coli</i> y cultivos bioprotectores o nisina.....	102
6.4.3.2. Crecimiento de coliformes totales y producción de aminas.....	105
6.4.3.3. Producción de aminas biogénicas en muestras inoculadas con <i>P. fluorescens</i> y cultivos bioprotectores o nisina.....	106
6.4.3.4. Población de pseudomonas y producción de aminas biogénicas.....	108
6.5 Cambios en las propiedades fisicoquímicas.....	110
6.5.1. pH y acidez total titulable.....	110
6.5.2. Capacidad de retención de agua .....	113
6.5.3. Producción e ácidos grasos de cadena corta.....	115
6.5.3.1. Producción de ácido láctico.....	116
6.5.3.2. Producción de ácido acético.....	117
6.5.3 Efectos sobre la textura.....	119
6.5.4 Efecto sobre las proteínas miofibrilares.....	122
6.5.5 Efectos sobre el color.....	126
6.5.5.1. Tonalidad.....	126
6.5.5.2. Cromaticidad.....	128
6.5.5.3. Luminosidad.....	130
6.5.3.4. Diferencia total de color.....	132

---

7. CONCLUSIONES .....	134
8. BIBLIOGRAFÍA .....	137
10 ANEXOS.....	149
Anexo 1: Medios de cultivo.....	150
Anexo 2: Técnicas empleadas.....	153
Anexo 3: Curvas patrón y cromatogramas.....	157
Anexo 4: Análisis estadísticos.....	161

# ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 3.1</b> Composición química del tejido muscular magro de algunas especies....	7
<b>Tabla 3.2.</b> Composición de la fracción lipídica del tejido muscular de diversas especies.....	8
<b>Tabla 3.3</b> Producción total de aves bajo Inspección Federal en países específicos, 1995-1999.....	9
<b>Tabla 3.4</b> Composición de las proteínas del músculo esquelético de las aves.....	13
<b>Tabla 3.5</b> Número de reportes de enfermedades bacterianas asociadas al consumo de alimentos, brotes, casos y mortalidad en Estados Unidos, 1993-1997.....	21
<b>Tabla 3.6</b> Análisis aproximado de pollo (por 100 g de porción comestible, peso en base húmeda.....	25
<b>Tabla 3.7</b> Agrupación de bacterias basada en los efectos de la temperatura sobre el crecimiento.....	28
<b>Tabla 3.8</b> Algunos compuestos volátiles originados por microorganismos establecidos en la carne.....	30
<b>Tabla 3.9</b> Porción de ácido total disociado a diferentes valores de pH.....	37
<b>Tabla 3.10</b> Criterios de selección de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas para la biopreservación de carnes.....	42
<b>Tabla 3.11</b> Clasificación de las bacteriocinas con base en su estructura.....	45

<b>Tabla 3.12</b>	Características diferenciales de las bacterias lácticas.....	49
<b>Tabla 3.13</b>	Características de las bacteriocinas producidas por <i>Lactococcus spp.</i> .....	50
<b>Tabla 3.14</b>	Cepas bacteriogénicas productoras de bacteriocinas clase II aisladas a partir de carne y productos cárnicos.....	52
<b>Tabla 5.1</b>	Condiciones de incubación empleadas por las proteasas empleadas para probar la sensibilidad de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454.....	62
<b>Tabla 5.2</b>	VARIABLES Y NIVELES EMPLEADOS PARA LA SELECCIÓN DEL INÓCULO, FUENTE Y CONCENTRACIÓN DE CARBONO.....	63
<b>Tabla 5.3</b>	Microorganismos de importancia en la salud y causantes de deterioro empleados.....	69
<b>Tabla 5.4</b>	Condiciones cromatográficas para el análisis de ácidos orgánicos.....	73
<b>Tabla 5.5</b>	Parámetros empleados en la prueba de Warner-Bratzler.....	74
<b>Tabla 6.1</b>	Sensibilidad de la bacteriocina producida por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 frente a enzimas.....	79
<b>Tabla 6.2</b>	Comparación de medias para pH y ATT por método de Duncan para la selección del inóculo y fuente de carbono.....	80
<b>Tabla 6.3</b>	Recuentos medios de la población de <i>Pseudomonas</i> en la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de cultivos bioprotectores y <i>Pseudomonas fluorescens</i> C65, adicionada con 5% de sacarosa y almacenada a 10 ±2°C.....	83
<b>Tabla 6.4</b>	Recuentos medios de la población de coliformes totales en la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de cultivos bioprotectores y <i>E. coli</i> ATCC 8937, adicionada con 5% de sacarosa y almacenada a 10 ±2°C.....	86
<b>Tabla 6.5</b>	Recuentos medios de la población de <i>Listeria</i> en la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de cultivos bioprotectores y <i>L. innocua</i> ATCC 33090, adicionada con 5% de sacarosa y almacenada a 10 ±2°C.....	89

<b>Tabla 6.6</b>	Recuentos medios de la población de <i>P. fluorescens</i> C65 en la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de cultivos bioprotectores o nisina, adicionada con 5% de sacarosa y almacenada a 10±2°C.....	92
<b>Tabla 6.7</b>	Recuentos medios de la población de coliformes totales en la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de cultivos bioprotectores o nisina y <i>E. coli</i> ATCC 8937, adicionada con 2.5% de sacarosa y almacenada a 10 ±2°C. ....	94
<b>Tabla 6.8</b>	Recuentos medios de la población de <i>Listeria</i> en la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de cultivos bioprotectores o nisina y <i>L. innocua</i> ATCC 33090, adicionada con 2.5% de sacarosa y almacenada a 10 ±2°C.....	96
<b>Tabla 6.9</b>	Producción de cadaverina (µg/g) en la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de cultivos bioprotectores o nisina, adicionada con 2.5 o 5% de sacarosa y almacenada a 10 ±2°C.....	99
<b>Tabla 6.10</b>	Producción de putrescina en la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de cultivos bioprotectores o nisina, adicionada con 2.5 o 5% de sacarosa y almacenada a 10 ±2°C.....	101
<b>Tabla 6.11</b>	Producción de cadaverina en la carne de pollo inoculada por inmersión con una mezcla de cultivos bioprotectores o nisina y <i>E. coli</i> ATCC 8937 adicionada con 2.5 y almacenada a 10 ±2°C.....	104
<b>Tabla 6.12</b>	Producción de putrescina en la carne de pollo inoculada por inmersión con una mezcla de cultivos bioprotectores o nisina y <i>E. coli</i> ATCC 8937 adicionada con 2.5% de sacarosa y almacenada a 10 ±2°C.....	104
<b>Tabla 6.13</b>	Producción de cadaverina en la carne de pollo inoculada por inmersión con una mezcla de cultivos bioprotectores o nisina y <i>P. fluorescens</i> C65 adicionada con 2.5 y almacenada a 10 ±2°C.....	107
<b>Tabla 6.14</b>	Producción de putrescina en la carne de pollo inoculada por inmersión con una mezcla de cultivos bioprotectores o nisina y <i>P. fluorescens</i> C65 adicionada con 2.5 y almacenada a 10 ±2°C.....	107

<b>Tabla 6.15</b>	Variación del pH y la ATT, en el músculo de pollo inoculado por inmersión con cultivos bioprotectores o nisina en presencia de 2.5% de sacarosa y almacenado a 10°C. ....	<b>112</b>
<b>Tabla 6.16</b>	Variación del pH y la ATT, en el músculo de pollo inoculado por inmersión con cultivos bioprotectores o nisina en presencia de 5% y 2.5 5% de sacarosa y almacenado a 10°C. ....	<b>112</b>
<b>Tabla 6.17</b>	Variación de la CRA del músculo de pollo inoculado por inmersión con cultivos bioprotectores o nisina en presencia de 2.5 y 5% de sacarosa y almacenado a 10°C. ....	<b>114</b>
<b>Tabla 6.18</b>	Cambios ocurridos en los niveles de ácido láctico y acético (mg/100 g de carne) durante el almacenamiento de carne de pollo inoculado por inmersión con cultivos bioprotectores o nisina en presencia de 2.5 de sacarosa y almacenado a 10°C. ....	<b>118</b>
<b>Tabla 6.19</b>	Variación en el esfuerzo al corte (N) durante el almacenamiento de carne de pollo inoculado por inmersión con cultivos bioprotectores o nisina en presencia de 2.5 y 5% de sacarosa y almacenado a 10°C.....	<b>122</b>
<b>Tabla A1</b>	Componentes del Medio GSP, selectivo para el crecimiento de <i>Pseudomonas</i> .....	<b>150</b>
<b>Tabla A2</b>	Componentes del medio F para el crecimiento selectivo y propagación de <i>Pseudomonas</i> .....	<b>151</b>
<b>Tabla A3</b>	Medio agar bilis y rojo violeta para la demostración y numeración de bacterias coliformes.....	<b>151</b>
<b>Tabla A4</b>	Caldo LB para el crecimiento y propagación de <i>E. coli</i> .....	<b>153</b>
<b>Tabla A5</b>	Medio CGB para la producción de bacteriocinas.....	<b>153</b>
<b>Tabla A6</b>	Soluciones empleadas para la extracción de proteínas miofibrilares.....	<b>154</b>
<b>Tabla A7</b>	Estándares empleados para el análisis de aminas biogénicas en músculo de pollo.....	<b>155</b>
<b>Tabla A8</b>	Gradientes de metanol empleados en la elusión de muestras analizadas por HPLC.....	<b>156</b>

<b>Tabla A9</b>	Análisis de varianza para la selección de la fuente y concentración de carbono.....	<b>161</b>
<b>Tabla A10</b>	Prueba múltiple de Duncan para la selección del inóculo y fuente de carbono.....	<b>161</b>
<b>Tabla A11</b>	Análisis de varianza para la variación del pH, ATT y CRA, del músculo de pollo tratado con bacterias lácticas o nisina y 5% de sacarosa, almacenado a $10 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 8 días.....	<b>162</b>
<b>Tabla A12</b>	Prueba múltiple de Duncan para la variación del pH, acidez total titulable (ATT) y capacidad de retención de agua (CRA) en el músculo de pollo tratado con bacterias lácticas o nisina en presencia de 5% de sacarosa, almacenado a $10 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 8 días.....	<b>162</b>
<b>Tabla A13</b>	Análisis de varianza para la variación del pH, ATT y CRA, del músculo de pollo tratado con bacterias lácticas o nisina y 2.5% de sacarosa, almacenado a $10 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 8 días. ....	<b>163</b>
<b>Tabla A14</b>	Prueba múltiple de Duncan para los parámetros fisicoquímicos pH, acidez total titulable (ATT) y capacidad de retención de agua (ATT) en el músculo de pollo inoculado con bacterias lácticas o nisina y 2.5% de sacarosa, almacenado a $10 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 8 días.....	<b>163</b>
<b>Tabla A15</b>	Análisis de varianza de los parámetros de color del músculo de pollo inoculado con bacterias lácticas o nisina y 5% de sacarosa almacenado a $10^\circ\text{C}$ .....	<b>164</b>
<b>Tabla A16</b>	Prueba múltiple de Duncan para la variación de los parámetros de color en el músculo de pollo tratado con bacterias lácticas o nisina y 5% de sacarosa almacenado a $10^\circ\text{C}$ .....	<b>164</b>
<b>Tabla A16</b>	Análisis de varianza de los parámetros de color del músculo de pollo inoculado con bacterias lácticas o nisina y 2.5% de sacarosa almacenado a $10^\circ\text{C}$ .....	<b>165</b>
<b>Tabla A17</b>	Prueba múltiple de Duncan para la variación de los parámetros de color en el músculo de pollo tratado con bacterias lácticas o nisina y 2.5% de sacarosa almacenado a $10^\circ\text{C}$ . ....	<b>165</b>
<b>Tabla A18</b>	Análisis de varianza de los parámetros de color del músculo de pollo inoculado con bacterias lácticas o nisina y 5% de sacarosa almacenado a $10^\circ\text{C}$ , después de 8 días de almacenamiento.....	<b>166</b>

<b>Tabla A19</b>	Análisis de medias por método de Duncan para la variación del color del músculo de pollo tratado con bacterias lácticas o nisina y 5% de sacarosa, almacenado a 10°C después de 8 días de almacenamiento. ....	<b>166</b>
<b>Tabla A20</b>	Análisis de varianza de los parámetros de color del músculo de pollo inoculado con bacterias lácticas o nisina y 2.5% de sacarosa almacenado a 10°C, después de 8 días de almacenamiento.....	<b>167</b>
<b>Tabla A21</b>	Prueba múltiple de Duncan para la variación del color del músculo de pollo tratado con bacterias lácticas o nisina y 2.5% de sacarosa, almacenado a 10°C después de 8 días de almacenamiento. ....	<b>167</b>
<b>Tabla A22</b>	Análisis de varianza para la textura del músculo de pollo inoculado con bacterias lácticas o nisina y 5% de sacarosa, almacenado a 10°C durante 8 días. ....	<b>168</b>
<b>Tabla A23</b>	Prueba múltiple de Duncan para la textura del músculo de pollo tratado con bacterias lácticas o nisina y 5% de sacarosa, almacenado a 10°C durante 8 días .....	<b>168</b>
<b>Tabla A24</b>	Análisis de varianza para la textura del músculo de pollo inoculado con bacterias lácticas o nisina y 5% de sacarosa, almacenado a 10°C durante 8 días. ....	<b>169</b>
<b>Tabla A25</b>	Prueba múltiple de Duncan para la textura del músculo de pollo tratado con bacterias lácticas o nisina y 2.5% de sacarosa, almacenado a 10°C durante 8 días.....	<b>169</b>
<b>Tabla A26</b>	Análisis de varianza para la producción de ácidos orgánicos en el músculo de pollo inoculado con bacterias lácticas o nisina y 2.5% de sacarosa, almacenado a 10°C durante 8 días. ....	<b>170</b>
<b>Tabla A27</b>	Prueba múltiple Duncan para la producción de ácidos orgánicos de pollo almacenado en condiciones de temperatura, sacarosa 2.5%.....	<b>170</b>
<b>Tabla A28</b>	Análisis de varianza para variación en la población de microorganismos indicadores en el músculo de pollo tratado con BAL o nisina + microorganismos indicadores y sacarosa 5%, y almacenado a 10°C durante 8 días.....	<b>171</b>

---

<b>Tabla A29</b>	Análisis de varianza para variación en la población de microorganismos indicadores en el músculo de pollo tratado con BAL o nisina + microorganismos indicadores y sacarosa 2.5%, y almacenado a 10°C durante 8 días.....	171
<b>Tabla A30</b>	Análisis de varianza para la producción de aminas en el músculo de pollo tratado con BAL o nisina y con una mezcla de BAL o nisina + microorganismos indicadores y sacarosa 5%, y almacenado a 10°C durante 8 días.....	172
<b>Tabla A31</b>	Análisis de varianza para la producción de aminas en el músculo de pollo tratado con BAL o nisina y con una mezcla de BAL o nisina + microorganismos indicadores y sacarosa 5%, y almacenado a 10°C durante 8 días.....	172

---

# ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 5.1</b> Diagrama para estudiar el efecto del empleo de cultivos bioprotectores y nisina sobre la población de microorganismos indicadores.....	68
<b>Figura 6.1</b> Evolución de los recuentos medios de la población de <i>Pseudomonas</i> de carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de cultivos bioprotectores y <i>P.fluorescens</i> C65, adicionada con 5% de sacarosa y almacenada a 10±2°C. ....	83
<b>Figura 6.2.</b> Evolución de los recuentos medios de la población de coliformes totales en carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de cultivos bioprotectores y <i>E. coli</i> , ATCC 8937 adicionada con 5% de sacarosa y almacenada a 10±2°C. ....	86
<b>Figura 6.3</b> Evolución de los recuentos medios de la población de <i>Listeria</i> en carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de cultivos bioprotectores y <i>L. innocua</i> ATCC 33090 adicionada con 5% de sacarosa y almacenada a 10±2°C. ....	89
<b>Figura 6.4</b> Evolución de los recuentos medios de la población de <i>Pseudomonas</i> de la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de cultivos bioprotectores o nisina y <i>P.fluoresens</i> C65, adicionada con 2.5% de sacarosa y almacenada a 10±2°C. ....	92
<b>Figura 6.5</b> Evolución de los recuentos medios de la población de coliformes totales en carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de cultivos bioprotectores y <i>E. coli</i> , ATCC 8937 adicionada con 2.5% de sacarosa y almacenada a 10±2°C.....	94
<b>Figura 6.6</b> Evolución de los recuentos medios de la población de <i>Listeria</i> en carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de cultivos bioprotectores y <i>L. innocua</i> ATCC 33090 adicionada con 2.5% de sacarosa y almacenada a 10±2°C. ....	96

<b>Figura 6.7</b>	Variación en la población de coliformes totales y producción de aminas biogénicas en la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión con <i>E. coli</i> ATCC 8937, adicionada con 2.5% de sacarosa.....	<b>105</b>
<b>Figura 6.8.</b>	Crecimiento de <i>Pseudomonas</i> y producción de aminas durante el almacenamiento a 10°C de la carne de pollo inoculada por inmersión con <i>Pseudomonas fluorescens</i> C65 y nisina, almacenada a 10°C.....	<b>109</b>
<b>Figura 6.9.</b>	Crecimiento de mesófilos aerobios y producción de aminas biogénicas durante el almacenamiento a 10°C de la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión con <i>Pseudomonas fluorescens</i> C65 y nisina.....	<b>109</b>
<b>Figura 6.10.</b>	Evolución del pH durante el almacenamiento a 10°C de la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de BAL o nisina en presencia de (a) 2.5% y (b) 5% de sacarosa. ■= Testigo, Δ= Nisina, ◇= <i>S. carnosus</i> MC-1-020555 y ○= <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454. ....	<b>111</b>
<b>Figura 6.11</b>	Evolución del pH y la CRA durante el almacenamiento a 10°C en las muestras testigo (sin inóculo), 5% de sacarosa.....	<b>115</b>
<b>Figura 6.12.</b>	Variación del esfuerzo al corte durante el almacenamiento a 10°C, de la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de BAL o nisina y 2.5% de sacarosa. ....	<b>121</b>
<b>Figura 6.13.</b>	Variación del esfuerzo al corte durante el almacenamiento a 10°C, de la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de BAL o nisina y 5% de sacarosa.....	<b>121</b>
<b>Figura 6.14.</b>	Perfil electroforético SDS-PAGE de las proteínas miofibrilares de la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de BAL y en presencia de 2.5 y 5% de sacarosa, almacenada a 10°C durante 4 días.....	<b>124</b>
<b>Figura 6.15.</b>	Perfil electroforético SDS-PAGE de las proteínas miofibrilares de la carne de pollo, inoculada por inmersión en una suspensión de cultivos bioprotectores y en presencia de 2.5 y 5% de sacarosa, almacenada a 10°C durante 8 días .....	<b>125</b>

<b>Figura 6.16.</b>	Evolución de la tonalidad durante el almacenamiento a 10°C de la carne de pollo inoculada en una suspensión cultivos bioprotectores o nisina y 5% de sacarosa.....	<b>126</b>
<b>Figura 6.17</b>	Evolución de la tonalidad durante el almacenamiento a 10°C de la carne de pollo inoculada en una suspensión cultivos bioprotectores o nisina y 2.5% de sacarosa.....	<b>126</b>
<b>Figura 6.18.</b>	Variación de la cromaticidad durante el almacenamiento a 10°C de carne de pollo inoculada por inmersión con cultivos bioprotectores o nisina y 5% de sacarosa .....	<b>129</b>
<b>Figura 6.19</b>	Variación de la cromaticidad durante el almacenamiento a 10°C de la carne de pollo inoculada por inmersión con cultivos bioprotectores o nisina y 2.5% de sacarosa.....	<b>129</b>
<b>Figura 6.20</b>	Variación en la coordenada de luminosidad ( <i>L</i> ) durante el almacenamiento a 10°C de la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de BAL o nisina y 5% de sacarosa .....	<b>131</b>
<b>Figura 6.21</b>	Variación en la coordenada de luminosidad ( <i>L</i> ) durante el almacenamiento a 10°C de la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de BAL o nisina y 2.5% de sacarosa .....	<b>131</b>
<b>Figura 6.22</b>	Comportamiento de $\Delta E$ durante el almacenamiento a 10°C de la carne de pollo inoculada en presencia de BAL o nisina y 5% de sacarosa. ....	<b>133</b>
<b>Figura 6.23</b>	Comportamiento de $\Delta E$ durante el almacenamiento a 10°C de la carne de pollo inoculada en presencia de BAL o nisina y 2.5% de sacarosa. ....	<b>133</b>
<b>Figura A1.</b>	Curva patrón de ácido acético.....	<b>157</b>
<b>Figura A2.</b>	Curva patrón de ácido láctico.....	<b>157</b>
<b>Figura A3</b>	Perfil cromatográfico de ácidos orgánicos de cadena corta mediante intercambio catiónico, en una columna -SH 1011 (8 x 300 mm); volumen inyectado 100 $\mu$ L, flujo 1 mL/ min y eluyente H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	<b>160</b>

---

<b>Figura A4</b>	Curva patrón para putrescina.....	<b>159</b>
<b>Figura A5.</b>	Curva patrón para cadaverina.....	<b>159</b>
<b>Figura A6.</b>	Cromatograma a 254 nm de la separación de aminas biogénicas, en una columna de fase reversa Simmetry C-18 ( 3.9 x 150 mm); volumen inyectado 50 µL, flujo 0.5 mL/min, en un gradiente de metanol del 55-100%.....	<b>160</b>

---

# ***1. INTRODUCCIÓN***

La producción y el consumo de la carne de ave se ha incrementado considerablemente en México y todo el mundo durante los últimos años (Maurer, 1993; INEGI, 1998).

Debido a su composición química rica en nutrientes,  $a_w$  cercano a 1 y un pH cercano a la neutralidad, la carne de pollo es muy susceptible de ser contaminada por microorganismos alterantes (Russell, 2001) y patógenos (Conner y col., 2001), sobre todo si las prácticas de sacrificio, manipulación, transporte y almacenamiento no son las adecuadas (Guidolin y col., 1998). Las pérdidas económicas debido al deterioro de las aves son muy cuantiosas y tan solo en los Estados Unidos éstas van de \$300 a 600 millones de dólares por año (Russell, 2001). Además, las aves pueden servir como reservorios de una gran variedad de patógenos incluyendo serotipos de *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* (Conner y col., 2001) y *Escherichia coli* 0157:H7 (Hargis y col., 2001).

En términos de seguridad alimentaria la carne de aves se encuentra entre los principales causantes de intoxicaciones y toxiinfecciones (Aymerich y Hugas, 1998; Baird-Parker, 2000). En este sentido *Salmonella* (no causante de tifoidea) continua siendo el principal patógeno asociado al consumo de aves y sus derivados. Las pérdidas económicas ocasionadas por la presencia de *Salmonella* en los alimentos también son elevados, por ejemplo, en Estados Unidos anualmente se pierden cerca de 1.4 billones de dólares en productividad humana, gastos médicos y costos de producción (Hargis y col., 2001). Por otra parte, la listeriosis también ha surgido durante los últimos años como una de las principales enfermedades asociadas al consumo de alimentos, siendo una de las enfermedades de mayor importancia en la salud pública ya que puede ocasionar meningitis, septicemia y abortos (Rocourt y Cossart, 1997). Esto es muy grave y lo peor es que parece ser que la incidencia de enfermedades asociadas a los alimentos crece constantemente en el mundo debido principalmente a la producción intensiva de animales, integración vertical de los procesos de producción animal y prácticas asociadas a cambios en los estilos de vida (Baird-Parker, 2000), además de la demanda creciente por alimentos sin aditivos (Leistner y Gorris, 1995) y aumento de la

población inmunocomprometida y finalmente la globalización en el abasto de los alimentos (Rocourt y Cossart, 1997; Baird-Parker, 2000).

Para incrementar la vida útil de la carne de pollo se ha recurrido al empleo de refrigeración (Aymerich y Hugas, 1998; Guidolin y col., 1998; Russell, 2001). Sin embargo, en muchas ocasiones la temperatura en los refrigeradores tanto comerciales como domésticos se encuentra por arriba de los 10°C (Montville y Winkowski, 1997), lo cual favorece el desarrollo de microorganismos patógenos y causantes de deterioro (Guidolin y col., 1998). De ahí la necesidad de buscar métodos complementarios a la refrigeración que al mismo tiempo satisfagan las demandas actuales del consumidor. En este sentido, cada día aumenta la demanda de alimentos más sanos, seguros, sin conservadores y con tratamientos suaves como la refrigeración o congelación. Una alternativa segura para incrementar la calidad microbiológica y la vida útil de la carne, tanto en refrigeración como en condiciones de abuso de temperatura es mediante el empleo de la biopreservación. Este método consiste en adicionar a la carne cultivos bioprotectores tales como bacterias lácticas productoras y no productoras de bacteriocinas, bacteriocinas purificadas o sus extractos (McMullen y Stiles, 1996; Lücke, 2000).

Los cultivos bioprotectores podrían controlar el desarrollo de la microflora patógena o causante de deterioro así como la aparición de sus productos de degradación incluyendo las aminos biogénicas, mediante la producción de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, entre otros compuestos; así como por la disminución del potencial redox y la competencia por nutrientes (McMullen y Stiles, 1996, Guidolin y col., 1998 y Lücke, 2000). Existen muchos estudios de la aplicación de cultivos bioprotectores y bacteriocinas para controlar la calidad microbiológica de la carne (McMullen y Stiles, 1996; Aymerich y Hugas, 1998; Hugas, 1998; Bredholt y col., 1999; Mahadeo y Tatini, 1994; y Lücke, 2000), pero muy pocos son aquellos estudios integrales en los que además de analizar la acción de los cultivos bioprotectores o bacteriocinas contra microorganismos de interés, también se analice su efecto sobre las características de calidad de la carne (Guidolin y col., 1998). Por lo que en este trabajo se estudiará el efecto de cultivos bioprotectores o nisina sobre ambos parámetros.

---

## **2. JUSTIFICACIÓN**

---

*Empleo de cultivos bioprotectores y nisina sobre la calidad microbiológica y fisicoquímica de carne de pollo almacenada en condiciones de abuso de temperatura*

---

Durante mucho tiempo, el empleo de cultivos bioprotectores entre las que se encuentran las bacterias lácticas ha demostrado ser una manera segura para conservar una gran variedad de alimentos incluyendo carne y leche, generando con ello cambios deseables en las características sensoriales (Vandenvergh, 1993; Montville y Winkowsky, 1997 y Caplice y col., 1999). Por otra parte, la carne de pollo es un alimento muy perecedero (Russell, 2001) y uno de los principales alimentos causantes de toxiinfecciones e infecciones alimentarias (Guidolin, 1998 y Conner y col., 2001), si se tiene en cuenta la demanda creciente por los alimentos mínimamente procesados y libres de aditivos (Leistner y Gorris, 1995), resulta de vital importancia el estudio del empleo de la biopreservación como una alternativa segura para aumentar la vida de anaquel y la seguridad microbiológica de la carne de pollo almacenada en refrigeración y en particular en condiciones de abuso de temperatura. Las bacterias ácido lácticas (BAL) productoras de bacteriocinas presenta un gran potencial. Puesto que la presencia simultánea de ácido láctico y bacteriocinas tiene un efecto sinérgico contra algunos microorganismos responsables de descomposición y patógenos. Además, las bacteriocinas no presentan riesgos para la salud debido a que son compuestos de origen proteico que pueden ser inactivados o desnaturalizados por las enzimas presentes en los jugos gástricos (Mc Mullen y Stiles, 1996).

---

### ***3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA***

### 3.1 Importancia de las aves en la alimentación humana

La carne de aves, incluyendo el pollo tiene una alta demanda en el mundo. Esto se debe en gran medida a la ausencia de tabúes culturales y religiosos, su rápida reproducción, disponibilidad y bajo costo (Maurer, 1993).

En la tabla 3.1 se presenta la composición química de la carne de varias especies. En ésta se puede observar que la carne de pollo presenta un porcentaje de proteína similar al presentado en las carnes de vacuno y cerdo, la cual se sabe es de muy buena calidad. Además, contiene una menor cantidad de grasa, la cual, según se observa en la tabla 3.2, es más insaturada que la de cerdos y vacunos, y por si fuera poco, contiene una menor cantidad de colesterol (Hultin, 1993). Por ello se presenta como una alternativa a la creciente demanda de alimentos más saludables bajos en grasas saturadas y colesterol que disminuyan el riesgo al desarrollo de enfermedades como la aterosclerosis y los infartos al miocardio.

**Tabla 3.1.** Composición química del tejido muscular magro de algunas especies (Hultin, 1993)

Especie	Composición (%)			
	Agua	Proteína	Lípidos	Cenizas
Vacuno	68-70	20-22	4-8	1
Cerdo	68-70	19-20	9-11	1.4
<b>Pollo</b>	<b>73.7</b>	<b>20-23</b>	<b>4-7</b>	<b>1</b>
Cordero	73	20	5-6	1.6
Bacalao	81.2	17.6	0.3	1.2
Salmón	64	20-22	13-15	1.3

En general, el consumo de aves y en particular el de pollo, ofrece grandes ventajas nutricionales. No obstante, también puede representar un gran riesgo potencial para la salud, sobre todo cuando las condiciones de obtención, distribución, almacenamiento y comercialización no son las adecuadas, ya que el mal manejo puede favorecer su rápido deterioro ocasionando con ello grandes pérdidas económicas y problemas de salud pública.

**Tabla 3.2.** Composición de la fracción lipídica del tejido muscular de diversas especies (Hultin, 1993)

Especie	Composición		
	% Saturados	% Monoenoicos	% Polienuicos Lípidos
Vacuno	40-71	41-53	0-6
Cerdo	39-49	43-70	3-18
Carnero	46-64	36-47	3-5
<b>Aves</b>	<b>28-33</b>	<b>39-51</b>	<b>14-23</b>
Bacalao (pescado magro)	30	22	48
Caballa (pescado graso)	30	44	26

### 3.1.1 Producción de aves

La producción y consumo de las aves se ha incrementado considerablemente en todo el mundo durante los últimos años (Tabla 3.3), siendo Estados Unidos (Maurer, 1993) el principal productor. En México la producción de aves ha aumentado considerablemente, sobre todo a partir de 1990 (INEGI, 1998). Por otra parte, se espera que la producción de pollo continúe creciendo debido a su empleo creciente en la elaboración de productos cárnicos, incluyendo aquellos bajos en calorías.

**Tabla 3.3.** Producción total de aves bajo Inspección Federal en países específicos, 1995-1999 (Agricultural Statistics, 2000; SAGAR 2000).

Región y país	1995	1996	1997	1998	1999
<b>Miles de toneladas métricas</b>					
<b>Norte América</b>					
Canadá	867	893	916	962	1,004
México*	1,554	1,600	1,615	1,710	1,809
Estados Unidos	13,786	14,522	14,952	15,128	15,891
<b>Total</b>	<b>16,201</b>	<b>17,015</b>	<b>17,483</b>	<b>17,800</b>	<b>18,794</b>
<b>América del Sur</b>					
Argentina	700	680	780	875	895
Brasil	4,140	4,144	4,562	4,600	5,105
Colombia	573	623	647	651	678
Guatemala	104	111	117	123	129
Honduras	41	42	53	59	60
Venezuela	410	5,991	395	380	375
<b>Total</b>	<b>5,932</b>	<b>7,088</b>	<b>6,554</b>	<b>6,688</b>	<b>7,242</b>
<b>Unión Europea</b>					
Francia	2,083	2,206	2,259	2,320	2,310
Alemania	633	638	682	719	740
Italia	1,123	1,151	1,177	1,195	1,135
Países Bajos	641	700	715	737	739
España	910	950	901	905	916
Reino Unido	1,394	1,443	1,502	1,513	1,516
<b>Total</b>	<b>6,798</b>	<b>7,088</b>	<b>7,236</b>	<b>7,389</b>	<b>7,356</b>
<b>Europa del Este</b>	992	1,057	1,083	1,110	1,117
Antes Unión Soviética	1,094	923	816	850	840
Medio Oriente	739	863	1,074	1,115	1,182
África	1,052	1,206	1,284	1,515	1,638
Asia	14,230	15,783	16,645	16,416	16,793
Oceanía	500	503	533	585	603
<b>Total</b>	<b>47,524</b>	<b>50,429</b>	<b>52,708</b>	<b>53,468</b>	<b>55,535</b>

## 3.2. Parámetros de calidad de la carne de pollo

La aceptación de la carne por parte de los consumidores depende de una serie de propiedades que en su conjunto dan como resultado un producto de aspecto atractivo a la hora de la compra. El estado general de la carne depende de propiedades como la capacidad de retención de agua, el pH, la textura, el color, así como la integridad de las proteínas miofibrilares.

### 3.2.1. pH

El pH determina en gran medida la aceptación por parte del consumidor debido a que influye sobre el color, textura, sabor, capacidad de retención de agua, entre otros. El pH de la carne depende de varios factores entre los que destacan las condiciones pre y *post-mortem* del animal (Guerrero y Arteaga, 1990), e incluyen el acondicionamiento y condiciones durante y después del sacrificio. El descenso del pH en la carne se encuentra determinado por la formación de ácido láctico en el músculo en la etapa *post-mortem*. Si el descenso es muy rápido y a altas temperaturas, se obtiene una carne pálida, suave y exudativa (PSE). Por el contrario, si el descenso es muy lento e incompleto se obtiene una carne oscura, firme, seca (DFD) y de vida útil reducida (Price y Scheigert, 1981).

### 3.2.2. Capacidad de retención de agua (CRA)

La capacidad de retención de agua (CRA) se define como la capacidad que tiene la carne para retener el agua, tanto propia como añadida durante la aplicación de fuerzas externas como el cortado, tratamiento térmico o prensado (Trout, 1989; Ponce y col., 2000). La carne, incluyendo el pollo, contiene 70% de agua (Baker y Bruce, 1989) la cual se encuentra asociada a las proteínas miofibrilares, en el sarcoplasma y entre los espacios extracelulares. La capacidad de retención de agua (CRA) depende de factores tales como el pH final de la

carne, longitud del sarcómero, fuerza iónica, presión osmótica, la presencia de sales y el estado *post-rigor* (Pearson y Young, 1989).

### 3.2.3 Color

El color se define como una relación subjetiva, resultado de una compleja serie de respuestas fisiológicas y psicológicas a la radiación electromagnética de longitudes de onda comprendidas en el intervalo de 400-700 nm (Pérez Álvarez y col, 2000). Cualquier color tiene tres atributos: tonalidad, cromaticidad y luminosidad. La cromaticidad o matiz es el resultado de cierta longitud de onda de la radiación de luz al incidir sobre un objeto. La tonalidad, pureza o saturación describe la intensidad de un color fundamental y la luminosidad o brillo en un índice de refractancia de la luz del color o brillantez (Wheeler y col., 1993). El color de la carne es una cualidad sensorial que depende de varios factores entre los que destacan el pH, estado de las proteínas miofibrilares, el estado *post-mortem*, el tipo de músculo, la especie, edad y alimentación (Pérez-Álvarez y col., 2000).

### 3.2.4. Textura

La textura es una propiedad relacionada con los elementos estructurales de la carne y junto con el color son tal vez las principales características sensoriales en las cuales los consumidores fijan su interés a la hora de adquirir cualquier tipo de carne. La textura de la carne depende de varios factores entre los que destacan la velocidad y magnitud del cambio de pH, interacción actina-miosina y manejo *post-mortem* y grado de maduración debido a la actividad de proteasas endógenas (Hultin, 1993).

Existen varios métodos para evaluar la textura, entre ellos el método químico y los métodos de corte y compresión. El método químico consiste en determinar la cantidad de hidroxiprolina presente, medida indirecta del contenido de colágena en el tejido conectivo, a

mayor cantidad de colágeno, mayor dureza (Young y col., 1996). Por otra parte los métodos de compresión y corte se basan en la aplicación de fuerzas ya sea paralelas o perpendiculares a las fibras musculares de la carne para medir el grado de estiramiento o elongación antes del corte (Voisey, 1976).

#### **3.2.4.1. Proteínas de la carne y su importancia en las propiedades funcionales**

Los atributos sensoriales de la carne, tales como la textura y la apariencia dependen en gran medida de propiedades funcionales de las proteínas, las que a su vez dependen del estado de las proteínas de la carne (Smith, 2001). La carne de pollo contiene cerca de 20-23% de proteínas, se clasifican en tres categorías con base en su localización y solubilidad en miofibrilares, sarcoplámicas y del estroma (Greer, 1989; Baduí, 1999; Smith, 2001).

#### **3.2.4.2. Proteínas miofibrilares**

Las proteínas miofibrilares son proteínas solubles en soluciones salinas concentradas (Greer, 1989 y Baduí, 1999) pero son insolubles en agua. Comprenden alrededor de 50-56% de la proteína total del músculo esquelético (Smith, 2001). Con base en sus funciones fisiológicas dentro del músculo se clasifican en: a) proteínas contráctiles, las cuales son responsables de la contracción muscular, b) proteínas regulatorias, involucradas en la regulación y control de la contracción, y c) proteínas del citoesqueleto, mantienen la integridad estructural de la miofibrilla (Forrest y col., 1974; Smith, 2001) (Tabla 3.4).

## a) Miosina

La miosina es la proteína miofibrilar más abundante (50-56%), se encuentra en los filamentos gruesos tiene un peso molecular alrededor de 520 kDa, y se encuentra formada por 6 subunidades. Estas subunidades incluyen 2 cadenas pesadas de 222 kDa cada una y 2 pares de cadenas ligeras de 17 a 23 kDa (Price y Schweigert, 1981; Hultin, 1993; Smith, 2001). La miosina del músculo esquelético de pollo contiene 43 grupos sulfhidrilo y ningún enlace disulfuro y su punto isoeléctrico se encuentra alrededor de 5.3 (Smith, 2001)

**Tabla 3.4.** Composición de las proteínas del músculo esquelético de las aves (Smith, 2001)

Fracción proteica	Contenido de proteína total (%)
<b>Miofibrilar (Solubles en sal)</b>	<b>55</b>
Miosina	29
Actina	13
Tropomiosina	3.2
Troponinas C, I, T	3.2
Actininas	2.6
Desmina	2.1
Conectina	3.7
<b>Sarcoplásmica (Proteínas solubles en agua)</b>	<b>35</b>
Mioglobina y otras hemoproteínas	1.1
Ezimas glicolíticas	12
Enzimas mitocondriales	5
Enzimas lisosomales	3.3
<b>Estroma (insolubles)</b>	<b>3-6</b>
Colágena	5.2
Elastina	0.3
Reticulina	0.5

**b) Actina**

La actina es la segunda proteína miofibrilar más abundante (ya que constituye aproximadamente el 22% de la proteína total. Presenta un peso molecular de 42 kDa, Se cree que se encuentra en el músculo en los filamentos delgados formando cadenas helicoidales denominadas actina fibrilar, o F-actina. Por su parte la actina globular o G-actina, es la forma monomérica de la proteína (Price y Schweigert, 1981; Smith, 2001). Finalmente, la actina presenta un punto isoeléctrico alrededor de 4.8 (Smith, 2001).

**c) Proteínas reguladoras**

Se dividen en proteínas reguladoras mayores (tropomiosina, y troponina) y menores como la  $\alpha$ -actinina. Son las responsables de mantener la integridad de la actina y la miosina durante el proceso de contracción relajación. (Lawrie, 1985).

**3.2.4.3. Proteínas sarcoplásmicas**

Estas proteínas son solubles en agua y en soluciones de baja fuerza iónica (<0.6 M) (Greer, 1989, Smith, 2001). Comprenden alrededor del 30-35% de la proteína total del músculo esquelético. La mioglobina, hemoglobina, enzimas sarcoplásmicas, mitocondriales, citocromos y flavoproteínas forman parte de este grupo (Price y Schweigert, 1981).

**3.2.4.4. Proteínas del estroma**

Son proteínas insolubles en agua y soluciones salinas, se encuentran formando parte de los tendones, la piel y el hueso. Comprenden del 3 al 6% de las proteínas del músculo esquelético de las aves. La colágena, reticulina y elastina forman parte de este grupo (Baduí, 1999; Smith, 2001).

### 3.3. Origen, tipo e importancia de los microorganismos presentes en la carne de pollo

Generalmente se asume que los tejidos internos de los animales sanos se encuentran libres de bacterias (Jay, 1994 y 1996). Sin embargo, la contaminación microbiana de la carne ocurre, en primer término, como resultado del proceso de sacrificio y manejo *post-mortem* (Guerrero y Taylor, 1994).

La microflora primaria del pollo y de las aves en general está constituida principalmente por bacterias Gram-negativas. Entre otras bacterias Gram-positivas, los enterococos son la flora más frecuentemente encontrada junto con los lactobacilos (Jay, 1996). También es frecuente hallar un gran número de hongos incluyendo *Penicillium*, *Mucor* y *Cladosporium*; y levaduras de los géneros *Candida* y *Rhodotorula* (Jay, 1996). Estos microorganismos tienen su origen en la piel de las aves, los tractos respiratorios, y gastrointestinal, y a veces pueden proceder del proceso de matanza por el empleo de cuchillos, agua contaminada (Jay, 1994 y 1996).

#### 3.3.1. Microorganismos causantes de deterioro

El deterioro de la carne puede ocurrir por las reacciones bioquímicas, en donde participan proteasas endógenas, oxidación de los lípidos (Lawrie, 1985) y las reacciones provocadas por el metabolismo microbiano, las que son las principales causas de deterioro de la carne (Gill, 1986). En éste sentido, en los Estados Unidos se procesan cerca de 7 mil millones de pollos cada año, de los cuales, 80% son vendidos como producto fresco. De este total se estima que del 2 al 4% de esta carne se pierde como resultado del deterioro, lo cual equivale, a pérdidas que van de \$300 a 600 millones de dólares por año (Russell, 2001).

Las principales causas del deterioro de la carne de pollo son: (1) prolongado tiempo de almacenamiento y distribución, (2) inapropiada temperatura de almacenamiento o

fluctuaciones en la temperatura por arriba de 4°C durante el almacenamiento en refrigeración, distribución y venta al menudeo y (3) una alta cuenta microbiana inicial.

Al principio, la microflora del pollo almacenado aeróbicamente a 4°C se encuentra integrada por *Pseudomonas* y un poco menos *Acinetobacter*, *Psychrobacter* y *Shewanella putrefaciens* (antes *Pseudomonas putrefaciens*) (Barnes e Impey, 1968, 1975; McMeekin, 1975, 1977). Las pseudomonas presentes pueden ser de dos tipos: fluorescentes o pigmentadas y no pigmentadas (Barnes e Impey, 1968). La composición de la microflora puede variar dependiendo de la parte anatómica, por ejemplo *Pseudomonas* es dominante en toda la canal, pero *Acinetobacter* y *S. putrefaciens* están restringidos a músculo blanco de pollo por el bajo valor de pH (5.7-5.9) comparado con el músculo rojo (6.4-6.7) (Jackson y col., 1997).

#### 3.3.1.1. *Pseudomonas*

Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Son Gram-negativas, aeróbicas y la mayor parte de ellas pueden crecer dentro de condiciones ácidas (Jay, 1996). Tienen una extensa capacidad oxidativa, y pueden crecer a expensas de una amplia variedad de compuestos solubles, incluyendo compuestos nitrogenados de bajo peso molecular. En ausencia de azúcar pueden atacar a los aminoácidos y producir malos olores debidos a la formación de ésteres, sulfhidrilos, ácidos, etc. Empiezan a utilizar los aminoácidos cuando la cantidad de bacterias excede  $10^8$  ufc/cm<sup>2</sup> y en este caso, la viscosidad llega a ser visible sobre la superficie de la carne (Gill, 1986).

Cuando las *Pseudomonas* crecen sobre substratos musculares pueden liberar amonio y aminoazúcares, compuestos que incrementan significativamente el pH y provocan con ello un aumento en la capacidad de hidratación de las proteínas que permite el desarrollo de otros microorganismos que no pueden crecer a pH ácido (Lea y col., 1969; Greer, 1989).

### 3.3.1.2. *Brochotrix termosphaeta*

Son bacterias Gram-positivas, no encapsuladas, no esporuladas, catalasa positivas y contienen citocromos. Las especies de *Brochrothrix* son anaeróbicas facultativas y no pigmentadas. Crecen en un rango de temperatura de 0-30°C (óptimo 20-25°C). Requiere de glucosa para crecer y como producto del metabolismo aerobio generan ácido acético y cetoína. Puede producir ácido isovalérico e isobutírico que son producidos por el metabolismo de la leucina y valina respectivamente (Tabla 3.4) (Gill, 1986, Guerrero y Taylor, 1994). Este microorganismo es el responsable de la generación de malos olores en la carne empacada al vacío, pero también se puede encontrar formando parte de la flora de carnes almacenadas en aire. Su crecimiento generalmente no es afectado por el pH en condiciones aeróbicas, sin embargo, en condiciones anaeróbicas su crecimiento es inhibido a pH inferior a 5.8 (Stiles, 1996).

### 3.3.1.3. Origen de los microorganismos causantes de deterioro en pollo

Las bacterias psicrotóficas presentes sobre las canales de pollo provienen principalmente de las plumas y las patas de dichas aves, del agua suministrada durante el procesamiento y los tanques de enfriamiento, y tienen su origen en la basura esparcida (Mulder y col., 1978). Estas bacterias son capaces de sobrevivir debido a la humedad presente sobre el equipo de procesamiento (Russell, 2001).

### 3.3.2. Microorganismos patógenos

La mayoría de las bacterias que contaminan el pollo son no patogénicas, y se encuentran asociadas con el deterioro de la carne. Sin embargo, el pollo sirve como reservorio de un gran

número de microorganismos patógenos incluyendo serotipos de *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* (Conner y col., 2001) y *Escherichia coli* 0157:H7 (Hargis y col., 2001). Estos microorganismos, como ya mencionamos en la sección 3.2, pueden crecer y representar un riesgo para la salud del consumidor (Aymerich y Hugas, 1998; García y col., 1995; Hugas, 1993).

### 3.3.2.1. *Salmonella*

Las Salmonelas son bacterias mesofílicas, facultativas, Gram-negativas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. *Salmonella spp* causa en humanos fiebre tifoidea y paratifoidea, y gastroenteritis. La gastroenteritis es causada por *Salmonella enteritis*, la cual se encuentra en el tracto gastrointestinal de los humanos y de los animales. Las aves han sido identificadas como los principales reservorios de esta bacteria. Existen más de 2300 serotipos. De estos, los serotipos *typhimurium*, *enteritidis* y *heidelberg* son más frecuentemente aislados de casos en humanos y también son los más comunes en aves. La presencia de salmonela sobre el pollo crudo puede ser el resultado del manejo inapropiado del producto durante la obtención, distribución y venta (Conner y col., 2001; D'Aoust, 1997). Las fiebres tifoidea y paratifoidea, así como la gastroenteritis son transmitidas de humanos a humanos por vía fecal-oral y en este caso caso, el humano es el único reservorio (Conner y col., 2001).

### 3.3.3.2 *Campylobacter*

Bacteria mesofílica, microaerofílica, Gram-negativa. *C. jejuni* y *C. lari* son los patógenos de mayor interés. De estas dos bacterias *C. jejuni* es la más comunmente asociado con las infecciones alimentarias. *C. jejuni* es la principal causa de diarrea en los Estados Unidos. Este microorganismos tiene su origen en el tracto gastrointestinal de los pollos y puede persistir si existe una preparación inadecuada del pollo (Conner y col., 2001).

### 3.3.3.3. *Listeria monocytogenes*

Es un bacilo Gram-positivo y psicrotrofo. Es un patógeno oportunista e infecta principalmente a la población inmuno-comprometida. Las mujeres embarazadas y sus productos, personas de la tercera edad, enfermos de SIDA y alcohólicos son los más afectados (Hugas 1993; Conner y col., 2001). En estos pacientes la listeriosis puede progresar a meningitis (Conner y col., 2001). Las bacterias del género *Listeria* se encuentran ampliamente distribuidas en el ambiente, por lo tanto su eliminación total es casi imposible (Hugas, 1993).

La contaminación post-cocimiento es el principal factor que permite la contaminación con *L. monocytogenes* de los alimentos listos para consumo. *L. monocytogenes* puede sobrevivir bien en el ambiente de la planta de procesamiento y es considerado como un contaminante del ambiente. El equipo de congelamiento también es considerado como fuente de este patógeno ya que puede sobrevivir a  $-1.5^{\circ}\text{C}$ . Otras fuentes de *L. monocytogenes* son el agua, el aire, personal, y todas las superficies de contacto (Conner y col., 20001).

### 3.3.3.4 *Escherichia coli*

Bacteria Gram-negativa, anaeróbica facultativa, oxidasa negativa, catalasa positiva, y mesófila. Produce gas a partir de glucosa y presenta actividad de lisina y ornitina descarboxilasa. Forma parte de la flora normal intestinal de los animales (Prescott y col., 1999), por lo que resulta un buen indicador de contaminación fecal. La mayoría de las *E. coli* aisladas de pollo son no patógenas para humanos. No obstante, las aves son altamente susceptibles a infectarse con *E. coli* 0157:H7, un microorganismo altamente patogénico que causa enteritis hemorrágica en humanos (Conner y col., 2001).

### 3.3.2.5. Importancia de la carne de aves como vehículo causante de toxiinfecciones e intoxicaciones

Las enfermedades asociadas a alimentos representan un gran problema de salud pública en todo el mundo. En la mayoría de los países occidentales las aves y las carnes rojas no procesadas se reportan como los principales vehículos causantes de toxiinfecciones e intoxicaciones (Baird-Parker, 2000) (Tabla 3.5). El Consejo para la Agricultura la Ciencia y la Tecnología de Estados Unidos reportó en 1994 en el informe titulado “*Patógenos asociados a alimentos: Riesgos y consecuencias*” que cerca de 9000 muertes y 6.5-33 millones de enfermedades en Estados Unidos cada año son causadas por la ingestión de alimentos contaminados. Los principales causantes de las intoxicaciones alimentarias son los microorganismos de los géneros *Salmonella* y *Campylobacter* (Netten y col., 1994). En 1997, *Campylobacter* (3966 casos) y *Salmonella* (2204 casos) ocasionaron cerca del 76% de las enfermedades asociadas a alimentos (Hargis y col., 2001). Actualmente la carne de aves en términos de seguridad alimentaria ocupan el primero o segundo lugar en enfermedades asociadas a alimentos en Australia, Canadá, Inglaterra y Gales, mientras que en Estados Unidos ocupa el tercer lugar (el 8% de los alimentos causantes de toxiinfecciones) (Connner y col., 2001).

**Tabla 3.5.** Número de reportes de enfermedades bacterianas asociadas al consumo de alimentos, brotes, casos y mortalidad en Estados Unidos\*, 1993-1997 (FDA, 2000).

Bacteria	Brotes		Casos		Muertes	
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
<i>Bacillus cereus</i>	14	2.14	691	1.58	0	0.00
<i>Brucella</i>	1	0.15	19	0.04	0	0.00
<i>Campylobacter</i>	25	3.82	539	1.23	1	3.57
<i>Clostridium Botulinum</i>	13	1.98	56	0.13	1	3.57
<i>Clostridium perfringes</i>	57	8.70	2772	6.33	0	0.00
<b><i>Escherichia coli</i></b>	<b>84</b>	<b>12.82</b>	<b>3260</b>	<b>7.44</b>	<b>8</b>	<b>28.57</b>
<i>Listeria monocytogenes</i>	3	0.46	100	0.23	2	7.14
<b><i>Salmonella</i></b>	<b>357</b>	<b>54.50</b>	<b>32610</b>	<b>74.42</b>	<b>13</b>	<b>46.43</b>
<i>Shigella</i>	43	6.56	1555	3.55	0	0.00
<i>Stahylococcus aureus</i>	42	6.41	1413	3.22	1	3.57
<i>Streotococcus grupo A</i>	1	0.15	122	0.28	0	0.00
<i>Streptococcus (otros)</i>	1	0.15	6	0.01	0	0.00
<i>Vibrio cholera</i>	1	0.15	2	0.00	0	0.00
<i>Vibrio parahemolyticus</i>	5	0.76	40	0.09	0	0.00
<i>Yersinia enterocolitica</i>	2	0.31	27	0.06	1	3.57
Otras bacterias	6	0.92	609	1.39	1	3.57
<b>Total</b>	<b>655</b>	<b>100</b>	<b>43821</b>	<b>100</b>	<b>28</b>	<b>100</b>

*Salmonella* (no causante de tifoidea) continua siendo el principal patógeno asociado a los alimentos, las aves y sus derivados prevalecen como vehículos de salmonelosis, lo cual trae consigo grandes pérdidas económicas. Para ilustrar lo anterior, basta con mencionar que tan sólo en los Estados Unidos anualmente se pierden cerca de 1.4 billones de dólares en productividad humana, gastos médicos y en los costos de producción (Hargis y col., 2001).

Además de *Salmonella* y *Campylobacter* existen otros microorganismos asociados al consumo de carne de aves, entre ellos destacan los géneros *Listeria* y *Escherichia coli* (Franco y col, 1995; Kotula y Pandya.,1995). En este sentido, la contaminación del pollo crudo con *L. monocytogenes* es alta en comparación con otros alimentos (Franco y col., 1995). La presencia de *L. monocytogenes* en pollo crudo representa un grave problema debido

a que puede producirse la contaminación cruzada con otros ingredientes durante la preparación de los alimentos en los hogares, y por la capacidad de éste microorganismo de sobrevivir en el pollo procesado. (Franco y col, 1995). Con respecto a *E. coli*, su presencia en canales de aves indica que existe contaminación con materia fecal, además, la presencia de formas virulentas de este microorganismo puede ocasionar enfermedades crónicas en humanos (Kotula y col.,1995).

### 3.3.2.6. Factores que contribuyen al aumento de las enfermedades asociadas a los alimentos

La incidencia de enfermedades asociadas a los alimentos en general crece constantemente. De acuerdo con Baird-Parker (2000), las principales razones por las cuales se han incrementado las enfermedades atribuidas a los alimentos son las siguientes:

- a) **Producción intensiva de animales:** esta práctica favorece la propagación de patógenos tanto humanos como de animales. Ejemplos recientes son la propagación de *Salmonella enteritis* PT4 en aves y *S. typhimurium* DT 104 en ganado.
- b) **Integración vertical de los procesos de producción animal y prácticas asociadas:** Se refiere a los productos de desecho de la matanza en la cadena alimenticia de los animales, lo cual da como resultado la presencia de salmonelosis y encefalopatía espongiiforme.
- c) **Cambios en los estilos de vida:** más tráfico de personas a países en donde los estándares de higiene son más bajos a los de los países de origen, permitiendo la exposición a microorganismos a los cuales ellos no tienen inmunidad. Incremento en el consumo de alimentos extranjeros los cuales en ocasiones son preparados en

condiciones antihigiénicas, lo cual trae consigo la exposición a microorganismos patógenos asociados a alimentos.

- d) **La demanda creciente por alimentos sin aditivos:** Crece la demanda de alimentos más naturales, es decir mínimamente procesados y libres de aditivos, con tratamientos suaves tales como el envasado en atmósferas modificadas y almacenado en refrigeración, altas presiones o la combinación de estos tratamientos (Leistner y Gorris,1995).
  
- e) **Cambios demográficos:** Al incrementarse la población crece el número de personas inmuno-comprometidas, cuyo porcentaje es de 20 a 25%. en los países occidentales.
  
- f) **Desnutrición:** La desnutrición de los habitantes del Tercer Mundo incrementa la susceptibilidad a las enfermedades. En muchas partes del mundo un gran número de personas abandona sus lugares de origen y se expone a condiciones extremas permitiendo la dispersión de enfermedades como el cólera y la disentería.
  
- g) **Globalización en el abasto de los alimentos:** El aumento en el comercio mundial de alimentos y materiales frescos, ocasiona que más personas se encuentren involucradas en el manejo de los alimentos, de manera que los riesgos se incrementan.

### 3.4. Factores que influyen el crecimiento de microorganismos en la carne de pollo

Para aumentar la vida de anaquel de los sustratos cárnicos y disminuir la incidencia tanto de microorganismos patógenos como causantes de deterioro, se han desarrollado varias estrategias de conservación entre las que destacan la fermentación láctica, la adición de aditivos como los nitritos, ácidos orgánicos; el empleo de atmósferas controladas, radiaciones y, más recientemente altas presiones, bacteriocinas, cultivos bioprotectores y la tecnología de barreras. Sin embargo, para decidir entre una u otra estrategia de conservación, es de vital importancia tener conocimiento acerca de la naturaleza de los alimentos así como todos aquellos factores intrínsecos y extrínsecos que contribuyen al desarrollo de los microorganismos (Gould, 2000).

#### 3.4.1. Factores intrínsecos

Se refieren a la naturaleza del alimento, incluyen factores físicos y químicos del alimento con los cuales un microorganismo contaminante está inevitablemente en contacto (Gould, 2000). La composición química, el pH, la actividad de agua ( $A_w$ ) y potencial oxido-reducción ( $Eh$ ), son ejemplos de estos parámetros (Jay, 1994; Montville, 1997; Gould, 2000).

##### 3.4.1.1. Composición química de la carne de pollo

Para que los microorganismos asociados a los alimentos puedan crecer y multiplicarse satisfactoriamente necesitan de los siguientes elementos (Jay, 1994):

- a) Agua
- b) Una fuente de energía
- c) Una fuente de nitrógeno
- d) Vitaminas y factores de crecimiento
- e) Sales minerales

De acuerdo con lo anterior, la carne de pollo resulta ser un buen sustrato para el sostenimiento del desarrollo de una gran variedad de microorganismos ya que contiene en suficiente cantidad agua, proteínas, grasas y en menor medida carbohidratos (Tabla 3.6). Además, presenta en su composición química a todos los aminoácidos esenciales, vitaminas del complejo B y minerales, como el potasio, magnesio y cobre (Maurer, 1993)

**Tabla 3.6.** Análisis aproximado de pollo (por 100 g de porción comestible, peso en base húmeda) (Maurer, 1993).

Nutriente	PCP*	PCP	pcp	pcp
	(cruda)	(asada)	(cruda)	(asada)
Agua (g)	69.46	62.44	69.91	60.92
Proteína (g)	20.85	29.80	18.15	25.96
Energía (kJ)	772	827	785	974
Lípidos				
Total (g)	9.25	7.78	12.12	13.46
Saturados	2.66	2.19	3.41	3.72
Monoinsaturados (g)	3.82	3.03	4.89	5.24
Poli-insaturados	1.96	1.66	2.65	3.00
Colesterol (mg)	64	84	83	92
Cenizas (g)	1.01	0.99	0.85	0.92
Sodio (mg)	63	71	79	87

\*PCP= pechuga con piel y pcp= pierna con piel, pierna sin piel

### 3.4.1.2 pH

El valor del pH de la carne determina en gran medida el desarrollo de microorganismos. La mayor parte de las bacterias crece mejor a un pH cercano a 7.0 (6.6-7.5) (Jay, 1994). El pH de músculo de pollo inmediatamente después del sacrificio se encuentra en un rango de 6.2-6.4. Sin embargo, se ha observado que puede variar con la localización anatómica y con ello el tipo de flora dominante. En este sentido, Barnes e Impey (1968) realizaron estudios sobre la

flora psicrótrofa que crecía a 1°C en pechuga y pierna de pollo y encontraron que *Acinetobacter* y *Alteromonas* crecían en la carne blanca. Asimismo, observaron que *Pseudomonas putrefaciens* crecía bien en ambos tipos de músculo, sin embargo, este microorganismo creció más rápido en el músculo de la pierna que en el de pechuga. Estas diferencias fueron ocasionadas por las diferencias en el pH ya que mientras la pechuga tenía un pH de 5.7-5.9, comparado con un pH de 6.4-6.7 en la pierna. Más tarde, esta diferencia en composición de la microflora en el músculo rojo y blanco de pollo fue observada por McMeekin (1977).

### 3.4.1.3 Actividad de Agua ( $a_w$ )

Otro de los elementos que determinan el desarrollo de los microorganismos es la cantidad de agua presente en los alimentos. La forma universal de expresar las necesidades de agua de los microorganismos es la actividad de agua o  $A_w$ , la cual se define como la relación existente entre la presión de vapor del agua del sustrato alimenticio y la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura (Jay, 1994):

$$a_w = P/P_0$$

Donde :

P = presión de vapor de la solución

P<sub>0</sub> = presión de vapor del solvente (agua pura)

La mayoría de los alimentos frescos presenta una actividad de agua superior a 0.99. La carne de pollo presenta una actividad de agua entre 1 y 0.95 (Jay, 1994) es ideal para el desarrollo de bacterias causantes de deterioro, ya que crecen a una  $a_w$  por arriba de 0.91. Con respecto las bacterias causantes de toxiinfecciones, se ha observado que *Staphylococcus aureus* puede desarrollarse a una  $a_w$  tan baja como lo es 0.86, mientras que *Clostridium botulinum* no crece por debajo de 0.91 (Jay, 1994).

### 3.3.1.5. Potencial Óxido-reducción (*Eh*)

El potencial oxido-reducción (*Eh*) se define como la facilidad con la que un sustrato pierde o gana electrones. Cuanto más intensamente sea oxidada una sustancia, más positivo será su potencial eléctrico, y cuando más intensamente esté reducida una sustancia, más negativo será su potencial eléctrico. Los microorganismos aerobios necesitan valores de *Eh* positivos (oxidados), mientras que los anaerobios y microaerofílicos necesitan valores negativos (reducidos). Con respecto al potencial redox de la masa muscular se ha observado que en la carne los grupos -SH favorecen el mantenimiento de las condiciones reductoras (Jay, 1994).

### 3.4.1. Factores extrínsecos

Este término se refiere a aquellos factores no relacionados con la naturaleza de los alimentos pero que influyen en el desarrollo de los microorganismos. Son aplicados desde afuera del alimento y actúan durante el almacenamiento (Gould, 2000). La temperatura de conservación y la composición de los gases son los principales factores extrínsecos que afectan el crecimiento microbiano (Montville, 1997).

#### 3.4.1.1. Temperatura de conservación

De acuerdo con su temperatura de crecimiento los microorganismos pueden ser clasificadas como psicrófilos, psicrótrofos, mesófilos y termófilos (Jay, 1994; Montville, 1997), en la Tabla 3.7 se muestran los rangos de temperatura a los cuales pueden crecer los tres primeros grupos de microorganismos. Muchas especies de bacterias no pueden ser clasificadas en una sola categoría debido a que su rango de temperatura es muy amplio. Por ejemplo, algunas especies de bacterias, tales como *Listeria monocytogenes*, pueden crecer tanto a temperaturas de refrigeración como a altas temperaturas (Russell, 2001).

**Tabla 3.7..** Agrupación de bacterias basada en los efectos de la temperatura sobre el crecimiento (Conner y col., 2001)

Clasificación	Rangos de temperatura que permiten el crecimiento (°C)		
	Mínimo	Óptimo	Máximo
Psicrófilos	-15-5	5-30	20-40
Psicrótrofos	-5-8	20-30	30-43
Mesofílicos	5-8	25-43	40-50

Las bacterias causantes de deterioro en el pollo son predominantemente psicrotróficas y psicrófilas, mientras que las principales causantes de infecciones e intoxicaciones alimentarias asociadas con el pollo son mesofílicas. La refrigeración además de retardar el deterioro microbiano puede ser importante para prevenir el incremento del número de patógenos en el pollo (Conner y col., 2001).

Por otra parte, el factor que más afecta el crecimiento de las bacterias psicrotróficas y por lo tanto, la vida de anaquel de la carne de pollo y las aves en general es el mantenimiento de la temperatura. Las variaciones en este parámetro ya sea durante el procesamiento, almacenamiento, distribución y venta podrían favorecer el aumento en la velocidad de crecimiento de los microorganismos (Conner y col., 2001).

#### 3.4.1.2. Presencia y concentración de gases en el ambiente

El crecimiento de los microorganismos sobre los sustratos cárnicos puede ser alterado mediante la modificación en la composición de los gases (oxígeno o dióxido de carbono) en el ambiente (Molin, 2000).

**a) Efecto del oxígeno**

El oxígeno es tóxico para todo tipo de vida si la presión parcial es suficientemente alta. Las explicaciones a esta toxicidad incluyen: la inactivación de ciertas enzimas, el incremento en la generación de peróxido de hidrógeno, la oxidación de la membrana de los lípidos y la producción in vivo de radicales superóxido. La presión parcial de oxígeno en aire es generalmente tóxica para microorganismos anaeróbicos debido a que no tienen sistemas eficientes para eliminar los radicales generados a partir del oxígeno (Molin, 2000).

*Pseudomonas* y *Shewanella* son ejemplos de microorganismos aeróbicos, sin embargo, también pueden crecer en condiciones anaeróbicas. Muchas bacterias pueden crecer tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, ejemplos, *Enterobacteriaceae*, *Aeromonas*, *Photobacterium* y *Brochotrix* (Molin, 2000).

**b) Efecto del CO<sub>2</sub>**

Todas las células requieren CO<sub>2</sub> para crecer, sin embargo, si la presión parcial de CO<sub>2</sub> se incrementa sobre ciertos niveles críticos, la actividad metabólica puede ser retardada debido a: la disminución del pH intracelular, así como por la inhibición (o estimulación) de reacciones catalizadas enzimáticamente y síntesis de enzimas (Molin, 2000).

El efecto inhibitor del CO<sub>2</sub> aumenta conforme disminuye la temperatura, debido a que hay una mayor solubilidad del CO<sub>2</sub> y una mayor formación de ácido carbónico. Esto trae como consecuencia que el pH de las carnes almacenadas con concentraciones elevadas de CO<sub>2</sub> sea ligeramente más bajo que el de las carnes almacenadas en atmósfera de aire. En general, las bacterias Gram-negativas (*pseudomonas*) son más sensibles al CO<sub>2</sub> que las Gram-positivas (bacterias lácticas) (Jay, 1994).

### 3.5. Importancia de las aminas biogénicas como compuestos generados durante el deterioro de la carne

Los microorganismos alterantes que se desarrollan sobre la superficie de la carne, favorecen la producción de olores y colores desagradables lo cual va en detrimento de la calidad. Los principales compuestos responsables de los malos olores en la carne son los compuestos sulfurados, ésteres, aldehídos, ácidos orgánicos y las aminas biogénicas (Lea y col., 1969; Guerrero y Taylor, 1994) (Tabla 3.8).

La presencia de las aminas biogénicas en la carne y sus derivados no solamente es indeseable por la producción de malos olores sino que además, pueden resultar un riesgo para la salud de los consumidores como lo veremos más adelante pero además pueden ser útiles como indicadores de la descomposición de la carne fresca.

**Tabla 3.8.** Algunos compuestos volátiles originados por microorganismos presentes en la carne (Guerrero y Taylor, 1994).

Microorganismos	Condición	Compuestos
<i>Pseudomonas spp.</i>	Sin glucosa utiliza los aminoácidos	Malos olores debido a sulfuro, ésteres y ácidos.
<i>B. thermosphacta</i>	Aeróbica: medio complejo  Anaeróbica: medio mínimo	Acetoína, acético, isobutirico, ácido isovalerico y sus aldehídos y alcoholes, ácidos grasos de cadena ramificada. Acido láctico y pequeñas cantidades de ácidos volátiles, olor ligero.
<i>Enterobacteriaceae</i>	A 10°C, Cuando glucosa y glucosa 6-P se agotan, utilizan aminoácidos.	Aminas biogénicas y compuestos sulfurados H <sub>2</sub> S.
Bacterias ácido lácticas	Utilizan principalmente glucosa y arginina.	Acidos grasos volátiles, algunas cepas también producen H <sub>2</sub> S.

### 3.5.1 Definición

Las aminas biogénicas son compuestos básicos nitrogenados de bajo peso molecular formados por la descarboxilación de aminoácidos o por aminación y transaminación de aldehídos y cetonas (Maijala, 1993; Silla, 1996). De acuerdo con su estructura química, pueden clasificarse en alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina y espermidina), aromáticas (tiramina, feniletildiamina) y heterocíclicas - histamina y triptamina- (Silla, 1996).

### 3.5.2. Funciones e importancia

Son sustancias con actividad biológica. Son importantes como fuentes de nitrógeno, precursores en la síntesis de hormonas, alcaloides y además como componentes del aroma de los alimentos. La putrescina, espermidina y cadaverina son componentes de las células vivas y están implicadas en la síntesis de ADN, ARN y proteínas, y en la estabilización de las membranas. (Silla, 1996; Hernández-Jover y col., 1997). En plantas, la putrescina, espermidina y espermina están implicadas en la división celular, florecimiento, desarrollo de frutos, respuesta al estrés y senescencia. En el hombre las monoamino oxidasas y las diamino oxidasas juegan un papel importante en la degradación de aminas en el cuerpo (Haláz y col., 1994).

El deterioro de los alimentos con un alto contenido de proteínas tales como la carne, puede estar acompañado por un incremento en la producción de descarboxilasas, por lo tanto, la presencia de aminas biogénicas ha sido sugerido como un indicador de deterioro de la carne y de otros alimentos (Haláz y col., 1994; Silla, 1996; Hernández-Jover y col., 1997). No obstante, es importante recordar que en productos cárnicos fermentados. Estas aminas pueden estar presentes como consecuencia de la actividad microbiana de algunos cultivos iniciadores empleados en la elaboración de productos cárnicos (Hernández-Jover y col., 1997; Treviño y col., 1997).

**225560**

### 3.5.3. Microorganismos productores

Los microorganismos de los géneros *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Photobacterium*, y bacterias lácticas de los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, y *Streptococcus*, son capaces de descarboxilar a más de un aminoácido (Silla, 1996). Muchas enterobacterias y ciertos lactobacilos como por ejemplo *Lactobacillus buchneri*, *L. brevis*, *L. divergens*, *L. higarzii* (aisladas de carne y productos cárnicos) (Maijala, 1993), así como microorganismos de los géneros *Pediococcus* y *Enterococcus* son particularmente activos en la producción de aminas biogénicas (Halász y col., 1994).

### 3.5.4. Factores que afectan la actividad aminodescarboxilasa

La producción de aminas en los alimentos requiere de la presencia de microorganismos capaces de producir descarboxilasas, cofactores o inductores para la descarboxilación, adecuadas concentraciones de aminoácidos, además de factores ambientales que favorezcan el crecimiento bacteriano y condiciones que conduzcan a la síntesis de descarboxilasas y la subsecuente descarboxilación (Maijala y col., 1995). Los factores que pueden afectar la producción de aminas en los alimentos son: la temperatura, el pH, la concentración de sales, la presencia de carbohidratos fermentables, la presencia de oxígeno, el potencial redox y las condiciones de manufactura (Silla, 1996).

### 3.5.5. Toxicidad de las Aminas biogénicas

El consumo de alimentos con grandes cantidades de estas aminas constituye un riesgo potencial para la salud de los humanos, sobre todo cuando existen al mismo tiempo otros factores de riesgo tales como los inhibidores de la monoaminaoxidasa, alcoholismo y las enfermedades gastrointestinales (Maijala, 1994; Hernández-Jover y col., 1997).

Las aminas secundarias como la cadaverina y la putrescina pueden reaccionar con el nitrato para formar sustancias carcinogénicas como las nitrosaminas, nitrosopirrolidina y nitrosopiperidina. Además, estas aminas han sido identificadas como potenciadores que aumentan la toxicidad de la histamina por depresión de la oxidación de la histamina (Halász y col., 1994; Hwang y col, 1995; Izquierdo-Pulido y col., 1996; Silla, 1996).

Los límites legales han sido establecidos únicamente para la histamina sólo en algunos productos pesqueros. Sin embargo, niveles toxicológicos han sido propuestos, tales como 10-100 mg de histamina /100 g de alimento y 100-800 mg de tiramina/kg de alimento (Hernández-Jover y col., 1997). Con respecto a la putrescina y cadaverina, aunque han sido reconocidos como potenciadores de la toxicidad de la histamina y tiramina, no se han establecido límites de seguridad en los alimentos (Hernández-Jover y col., 1997).

### **3.5.6. Aminas Biogénicas en productos fermentados**

Los cultivos iniciadores acortan el proceso de fermentación, y en algunos casos pueden prevenir la formación de aminas (Joosten y Nuñez, 1996) y reducir el crecimiento de algunos microorganismos causante de deterioro, como lo son las enterobacterias (Roig-Sagués y col., 1997) comúnmente relacionadas con la formación de aminas biogénicas. Sin embargo, existen evidencias de que algunos de estos cultivos pueden producir pequeñas cantidades de aminas biogénicas, entre ellas putrescina, cadaverina y tiramina (Eitenmiller y col., 1978; Santos-Buelga y col., 1986; Silla, 1996; Hernández-Jover y col., 1997).

### **3.5.7. Aminas biogénicas en carnes no fermentadas**

En productos no fermentados, la presencia de aminas biogénicas se considera como un indicativo de actividad microbiológica indeseable. En carne fresca, se ha observado que los contenidos de putrescina y cadaverina se incrementan durante el almacenamiento (Halász y col., 1994) tanto a temperatura ambiente como a bajas temperaturas (Silla, 1996). Por lo tanto,

la cantidad de estas aminas podría permitir evaluar la frescura de la carne. Así, valores por debajo de los 5 mg/kg podrían sugerir que se trata de una carne de alta calidad higiénica (Hernández-Jover y col., 1997). No obstante, hay que tener en cuenta que la presencia de aminas en alimentos no está necesariamente correlacionado con el crecimiento de microorganismos causantes de deterioro, debido a que no todos ellos son descarboxilasa positivos (Silla, 1996).

### 3.5.8. Putrescina y cadaverina como índices de calidad en la carne fresca

Como ya se mencionó anteriormente, la presencia de aminas biogénicas puede ser útil como índice de calidad de la carne. Haláz y col., (1994) señalaron que microorganismos psicrotrófos requieren de un nivel de  $10^5$  a  $10^{-6}$  ufc/g para producir cantidades significativas de putrescina. Asimismo, Koutsoumains y col. (1999) realizaron estudios en una variedad de pescado del Mediterráneo. Estos investigadores detectaron cantidades significativas de putrescina y cadaverina cuando la cuenta de *Pseudomonas* excedía  $10^6$  a  $10^7$  ufc/g. Con respecto a los coliformes, se ha encontrado una alta correlación entre los niveles de cadaverina y las cuentas de enterobacterias (Haláz y col., 1994). Estos datos sugieren que tanto la putrescina como la cadaverina podrían ser útiles como indicadores de la cuenta o cantidad de tales microorganismos.

*Pseudomonas* produce principalmente putrescina mientras que las enterobacterias preferencialmente forman cadaverina (Dainty, y col., 1986; Guerrero-Legarreta y Chávez-Gallardo, 1991; Haláz y col., 1994; Roig-Sagués y Eerola, 1997). Con respecto a las carnes empacadas al vacío, a bajas temperaturas, las enterobacterias juegan un papel importante en la acumulación de aminas (Halaz, 1994).

### 3.6. Control del deterioro de la carne fresca

La conservación de la carne fresca puede lograrse mediante el control de la velocidad de crecimiento de los microorganismos. Para ello, se debe modificar uno de los parámetros extrínsecos más importantes, es decir, la temperatura. La disminución de la temperatura a 4°C se conoce como refrigeración, y es el método más empleado para aumentar la vida de anaquel de la carne fresca sin alterar sus características de calidad. Este método restringe el crecimiento de mesófilos, no obstante, el crecimiento microbiano no se detiene totalmente y los microorganismos psicrótrofos principalmente de los géneros *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Moraxella*, *Acinetobacter* o *Brochrotrix thermosphacta* emergen como flora dominante (Jackson y col., 1997). Por otra parte, en ocasiones, la temperatura de los refrigeradores comerciales y domésticos se encuentra por arriba de los 4°C. Estos abusos en la temperatura, pueden ocasionar el aumento en la velocidad de crecimiento tanto de microorganismos capaces de alterar las características de calidad como patógenos. Por ello, el empleo de métodos complementarios tales como el empleo de ácidos orgánicos, atmósferas modificadas y la fermentación láctica son una alternativa viable para mejorar la calidad microbiológica y con ello la vida de anaquel de la carne (Garriga y col., 1996).

#### 3.6.1. Tratamientos con ácidos orgánicos

Los conservadores más empleados en la industria de los alimentos son los ácidos orgánicos débiles tales como el ácido acético, láctico, benzoico y sórbico (Brul y Coote, 1999). Estos ácidos tienen el estatus GRAS (generalmente reconocidos como seguros) (Lund y Eklund, 2000).

El mecanismo de inhibición de los ácidos orgánicos se basa, en principio, en que los ácidos acético y láctico en forma no disociada, pueden atravesar la membrana celular, disociarse en el citoplasma, e interferir en funciones celulares, como la traslocación de sustrato y la

fosforilación oxidativa. La disociación de los ácidos provoca el incremento de protones en el interior de la célula. Cuando la concentración de protones excede la capacidad tampón del citoplasma, se transportan hacia el exterior mediante una bomba de protones, reduciendo de esta manera las reservas energéticas de la célula. Cuando estas reservas se agotan, la bomba de protones se detiene y se provoca el descenso del pH interno, lo cual causa a su vez desnaturalización de las proteínas y desestabilización de otros componentes celulares (Requena y Peláez, 1995). El efecto antimicrobiano de los ácidos a una concentración dada no es igual, el ácido acético tiene un efecto inhibitorio mayor que el ácido láctico (Caplice y col., 1999).

El ácido láctico y acético pueden emplearse para descontaminar canales, su efectividad dependerá del grado de contaminación inicial, del tipo y la concentración del ácido, y la temperatura de las soluciones empleadas (Smulders y col., 1986; Jackson y col., 1997). En este sentido, el ácido láctico es más fuerte que el ácido acético ya que presenta una constante de disociación ( $pK_a = 3.86$ ) menor que el ácido acético ( $pK_a 4.75$ ). Por otra parte, las propiedades bactericidas de los ácidos orgánicos pueden ser potencialmente mejoradas incrementando la concentración y temperatura de la solución, sin embargo, esto puede afectar la calidad de las canales (Anderson y Marshall, 1990).

El ácido láctico es comúnmente empleado como descontaminante de la superficie de las carnes frescas de vacunos y aves, ya que reduce el número de enterobacterias y *Campylobacter* spp, favoreciendo la extensión de la vida de anaquel en refrigeración (Smulders y col., 1986). Anderson y Marshall (1990) realizaron un estudio en el que concluyeron que las enterobacterias mesofílicas podrían ser un indicador confiable de la descontaminación con ácido láctico sobre *Salmonella* spp y *Campylobacter jejuni*. Asimismo, Netten y col. (1994) observaron que el tratamiento con 1% de ácido láctico a pH de 3.0 a 21 °C por 30 segundos era efectivo contra *Campylobacter jejuni*. Por su parte Vega y col. (1998) concluyeron que el empleo de una mezcla de acetato de sodio, ascorbato de sodio, ácido cítrico y ácido ascórbico era efectivo contra el crecimiento microbiano, incluyendo coliformes. Ellebracht y col. (1999), observaron que el tratamiento de recortes de

carne de vacuno con una mezcla de agua caliente con ácido láctico, redujo los niveles de *E. coli* O15557:H7 y *Salmonella typhimurium*.

Los efectos que el ácido láctico tiene sobre las cualidades sensoriales de la carne dependen en gran medida de las concentraciones empleadas, por ejemplo, se ha observado que concentraciones de ácido láctico del 1% v/v y a pH de 2.4, no afectan la coloración de la superficie de la carne de vacuno (Smulders y col., 1986; Greer y Jones, 1991), de hecho, un importante efecto del tratamiento con ácidos es la prevención del enverdecimiento por inhibición del crecimiento de *A. putrefaciens* (Gill, 1986). Con respecto a los efectos sobre el olor y sabor, en experimentos realizados con ácido acético se observó que el ácido residual no necesariamente afecta el olor y el sabor de la carne ya que éste se evapora durante el almacenamiento en refrigeración (Gill, 1986).

El empleo de los ácidos orgánicos también tiene sus limitaciones ya que son generalmente inefectivos contra microorganismos causantes de deterioro en la carne a valores de pH por arriba de 6.0 (Gill, 1986) ya que al aumentar el pH por arriba de 5, el porcentaje de ácido no disociado disminuye considerablemente (Tabla 3.9)

**Tabla 3.9.** Porción de ácido total no disociado a diferente pH

Ácido orgánico	pKa	% de ácido total no disociado			
		pH			
		3	4	5	6
Ácido acético	4.75	98.5	84.5	34.9	5.1
Ácido láctico	3.86	86.6	39.2	6.05	0.64

### 3.6.2. Atmósferas modificadas

La vida de anaquel de la carne puede ser aumentada por modificación en la composición del aire, ya sea aumentando o disminuyendo el contenido de oxígeno o de dióxido de carbono. Este método de conservación se denomina “almacenamiento en atmósferas modificadas” (Jay, 1994). La carne se coloca dentro de una película impermeable al oxígeno con un espacio de cabeza, el cual puede tener evadas cantidades de CO<sub>2</sub>, nitrógeno, y oxígeno en varias proporciones. La extensión de la vida de anaquel es el resultado de la modificación de la flora causante de deterioro, es decir psicrótrofa aerobia consistente de *Pseudomonas*, *Moraxella* y *Acinetobacter* a bacterias ácido lácticas y *B. thermosphacta* (Jackson y col., 1997).

Debido a su efecto bacteriostático, el dióxido de carbono es frecuentemente empleado en la composición de las atmósferas modificadas. Su presencia restringe el crecimiento de los microorganismos aerobios, altera las propiedades de la membrana celular y de los sistemas enzimáticos así como el pH intracelular. (Jackson y col., 1997). Sin embargo, el empleo de dióxido de carbono presenta algunos inconvenientes en algunos empaques de atmósferas modificadas en donde se encuentra como principal componente, ya que debido a su alta solubilidad en agua puede causar una disminución en el volumen del gas y ocasionar el colapso del empaque (Molin, 2000).

### 3.6.3. Empacado al vacío

La vida de anaquel de la carne fresca puede ser extendida por el empacado al vacío en películas que tengan una baja permeabilidad a los gases atmosféricos. Este método de conservación también proporciona una atmósfera modificada ya que el aire es removido (Molin., 2000). El contenido de oxígeno es reducido hasta 1% debido a la actividad respiratoria de los tejidos musculares frescos y en menor medida de la microflora aerobia o facultativa (Pettersen y col., 1984; Jackson y col., 1997). Además, la tensión de CO<sub>2</sub>, incrementa cerca del 20 % (v/v) (Dainty y Mckey, 1992).

Durante el almacenamiento al vacío y en atmósferas controladas, el crecimiento de la flora aeróbica causante de deterioro es suprimido (Molin, 2000). En estas condiciones, las bacterias ácido lácticas (BAL) y *Brochothrix thermosphacta* emergen como flora dominante. Las BAL son favorecidas por su alta velocidad de crecimiento, por su metabolismo fermentativo, su capacidad para producir sustancias antagónicas (ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas) y su habilidad para crecer al pH de la carne. A pH por arriba de 5.8, *B. thermosphacta* puede crecer y contribuir al deterioro, sin embargo, no puede crecer en condiciones anaeróbicas cuando el pH está por debajo de 5.8 (Jackson y col., 1997).

La vida de anaquel de la carne refrigerada envasada al vacío puede extenderse de 3 a 5 veces más que aquella almacenada en aire. Sin embargo, esto no aplica para carnes de vacuno o de aves con un alto pH como en la carne DFD. En este caso, el aumento en la vida de anaquel es de tan sólo 2 veces más que aquella almacenada en aire (Molin, 2000).

#### 3.6.4 Bioconservación

Una nueva generación de alimentos llamados “Alimentos mínimamente procesados” ha surgido como consecuencia de la demanda creciente por parte de los consumidores, de alimentos más frescos, naturales y más seguros, sin la presencia de aditivos. En ellos se emplean técnicas suaves de conservación como la refrigeración, el empacado en atmósferas controladas y la bioconservación (Ohlsson, 1994; Stiles, 1996). Asimismo, ha surgido el término “tecnología de barreras” que consiste en emplear una combinación de factores físicos, químicos y microbiológicos con el fin de obtener alimentos seguros, que sean estables respecto al deterioro microbiológico (Leistner y Gorris, 1995). En este sentido, los cultivos bacteriogénicos y/o sus bacteriocinas también podrían ser útiles en la preservación mediante dicha técnica (Garriga y col., 1993; Stiles, 1996).

### 3.6.4.1. Definición

La biopreservación o bioconservación se define como la extensión de la vida útil e incremento de la seguridad sanitaria de los alimentos mediante el desarrollo de la microflora natural o seleccionada, o sus metabolitos, para la elaboración de productos más saludables, naturales y convenientes, menos industrializados y con un gusto más suave (Stiles, 1996; Aymerich y Hugas, 1998).

### 3.6.4.2. Bioconservación y cultivos bioprotectores

Según Stiles (1996) la bioconservación puede aplicarse mediante la adición de:

- cepas bacterianas que crecen rápidamente y /o producen sustancias antagonistas
- sustancias antagonistas puras
- concentrado de un organismo antagonista
- bacterias lácticas mesofílicas como protección en contra de los abusos de temperaturas

Las bacterias lácticas son los microorganismos ideales para ser empleados como cultivos iniciadores o bioprotectores ya que forman parte de la flora endógena de la carne; además se han empleado desde hace mucho tiempo en la conservación de carne, leche y otros alimentos sin representar ningún riesgo para la salud, son conocidos como GRAS o “Generalmente reconocidos como seguros” por sus siglas en inglés (Aymerich y Hugas, 1998). No obstante, aún sabiendo que las bacterias lácticas poseen características deseables para ser empleadas como cultivos iniciadores, es necesario hacer una buena selección dentro de las mismas, debido a que no todas las bacterias lácticas son inocuas y algunas producen metabolitos indeseables, que causan malos olores y sabores cuando crecen sobre carne almacenada dentro de condiciones anaeróbicas (McMullen y Stiles, 1996).

### 3.6.4.3. Criterios de selección de los cultivos bioprotectores

Un cultivo bioprotector es un cultivo bacteriano capaz de aumentar la seguridad microbiológica de los alimentos sin modificar sus cualidades sensoriales y según Holzapfel y col. (citado por Aymerich y Hugas, 1998), debe de cumplir con las siguientes características:

- No debe tener ningún riesgo para la salud, es decir, no debe producir toxinas, aminos biogénicas, u otras sustancias tóxicas.
  
- Debe tener efectos beneficiosos para el producto: adaptarse con facilidad, ser estable, poder predecir su comportamiento ante otros factores, competitivo ante la flora endógena, poseer actividades enzimáticas deseables.
  
- No debe producir efectos negativos sobre las cualidades sensoriales
  
- Debe ser capaz de funcionar como indicador de contaminación microbiana ante condiciones de abuso de temperatura

Con respecto a las bacterias lácticas productoras de bacteriocinas, y de acuerdo con McMullen y Stiles (1996), además de las características anteriores deben de cumplir con los requisitos que se muestran en la tabla 3.10.

225560

**Tabla 3.10.** Criterios de selección de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas para la biopreservación de carnes según McMullen y Stiles, 1996.

Criterio de selección	Característica deseable
Habilidad para crecer en carnes	Psicrótrofa
Producción de bacteriocinas	Seguro Tiempo de producción relacionado con el crecimiento
Actividad de bacteriocinas	Activo y estable en el ambiente cárnico Actividad bactericida Temprana producción en el ciclo de crecimiento.
Cambios sensoriales	Limitada producción de ácido Limitada producción de gas Ausencia de producción de polisacáridos Baja actividad proteolítica

Para que la tecnología de la bioconservación sea efectiva es necesario tener en cuenta la naturaleza del producto cárnico, ya que es necesario que el microorganismo crezca y produzca las sustancias antibacterianas, entre ellas las bacteriocinas. Por ejemplo, aunque *Lactococcus lactis* subs *lactis* produce nisina *in situ*, su empleo no sería exitoso debido a que este microorganismo es mesófilo y no crece en la carne almacenada a muy bajas temperaturas (McMullen y Stiles, 1996). Sin embargo, podría estudiarse su efecto en carnes almacenadas en condiciones de abuso de temperatura

#### 3.6.4.4. Importancia de la aplicación de cultivos bioprotectores en la carne

Los “alimentos mínimamente procesados” reciben un ligero tratamiento térmico, están libres de aditivos, se empaacan al vacío y se mantienen en refrigeración para su conservación (Ohlsson, 1994). Estas barreras no son suficientes para prevenir el crecimiento de microorganismos patógenos psicrófilos, particularmente *L. monocytogenes*, el cual resulta ser una amenaza para la salud ya que puede crecer a 4°C y podría multiplicarse rápidamente si

---

se abusa de la temperatura (Campos y col., 1997). De ahí que la aplicación de las bacterias lácticas y sus bacteriocinas como bioconservadores tengan un gran potencial en la conservación de este grupo de alimentos (Foegeding y col., 1992).

Por otra parte, la biopreservación de las carnes podría ser de gran ayuda en los países en vías de desarrollo en los cuales, debido a la falta de las buenas prácticas de manufactura e higiene en la obtención de la carne, la falta o ausencia de la cadena de frío y las altas temperaturas, dan como resultado la contaminación de las canales con microorganismos patógenos y causantes de deterioro. En este sentido, Guerrero y col. (1995) realizaron estudios de inoculación de carne de cerdo y vacuno con bacterias lácticas como una medida de descontaminación en condiciones semitropicales (25°C) y observaron que *L. bulgaricus* y *P. pentosaceus* fueron efectivos en la reducción de *Pseudomonas* en carne de cerdo y vacuno (Rodríguez y col., 1998).

### 3.7. Bacterias ácido lácticas y sus metabolitos

Las bacterias ácido lácticas son un grupo de bacterias Gram-positivas, no esporuladas, catalasa negativas, desprovistas de citocromos, de hábitat anaeróbico pero aerotolerantes, exigentes, ácido tolerantes, y que producen principalmente ácido láctico a partir de la fermentación de azúcares (Alxesson, 1993). Son bacterias mesofílicas pero pueden crecer a temperaturas tan bajas como 5°C y tan altas como 45°C (Caplice y col, 1999). Comprenden los generos *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus*. De estos géneros, *Lactobacillus* es un importante grupo asociado con carnes almacenadas anaeróbicamente (Alxesson, 1993).

---

Las BAL presentan un efecto antimicrobiano el cual se debe a la gran cantidad de metabolitos que estas producen incluyendo ácido láctico, acético, peróxido de hidrógeno, diacetilo, reuterina, y bacteriocinas entre otros (Alxesson, 1993; Manzanares, 1997; Caplice y col., 1999).

### 3.7.1. Clasificación

La clasificación de las BAL está basada en la morfología, modo de fermentación de la glucosa, crecimiento a diferentes temperaturas, producción de ácido láctico, habilidad para crecer en altas concentraciones de sales y tolerancia a ácidos y bases (Axelsson, 1993). Actualmente la clasificación e identificación de las bacterias ácido lácticas se puede realizar comparando la secuencia de ribonucleótidos en la fracción ribosomal 16S, así como mediante el análisis de la composición de ácidos grasos (Bhunja y col, 1988).

De acuerdo con la ruta metabólica empleada para la fermentación de la glucosa se clasifican en: homofermentativas, las cuales producen ácido láctico como principal producto de degradación de la glucosa y heterofermentativas, que además de ácido láctico (50%), pueden producir CO<sub>2</sub>, etanol, ácido acético y acetaldehído (Alxesson, 1993; Guerrero y Taylor, 1994). *Leuconostoc* y un subgrupo de lactobacilos son heterofermentativos, mientras que todas las demás bacterias lácticas son homofermentativas (Alxesson, 1993) (Tabla 3.11).

**Tabla 3.11.** Características diferenciales de las bacterias lácticas<sup>a</sup> (Alxesson., 1993)

Característica	Bacilos				Cocos				
	<i>Carnob.</i>	<i>Lactob.</i>	<i>Aeroc.</i>	<i>Enteroc.</i>	<i>Lactoc.</i> <i>Vagococ.</i>	<i>Leucon.</i>	<i>Pedioc.</i>	<i>Streptoc.</i>	<i>Tetragenoc.</i>
Formación de CO <sub>2</sub> de glucosa <sup>b</sup>	-	±	-	-	-	+	-	-	-
Crecimiento a 10°C	+	±	+	+	+	+	±	-	+
Crecimiento a 45°C	-	±	-	+	-	-	±	±	-
Crecimiento en 6.5% NaCl	ND <sup>d</sup>	±	+	+	-	±	±	-	+
Crecimiento en 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Crecimiento a pH 4.4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-
Crecimiento a pH 9.6	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Acido láctico <sup>c</sup>	L	D, L, DL <sup>e</sup>	L	L	L	D	L, DL <sup>e</sup>	L	L

<sup>a</sup>+ positivo; -, negativo; ±, respuesta variada entre especies; ND, no determinado.

<sup>b</sup> Prueba para homo o heterofermentación de glucosa; negativo y positivo denota homofermentativo y heterofermentativo, respectivamente.

<sup>c</sup> Configuración del ácido láctico producido a partir de glucosa.

<sup>d</sup> se ha reportado que no crece en 8% de NaCl.

<sup>e</sup> Producción de ácido láctico D-, L-, o DL variación entre especies.

### 3.7.2. Ácidos Orgánicos

Durante el proceso de fermentación, las BAL producen por diferentes vías ácidos orgánicos, principalmente ácido acético y láctico. Estos ácidos no son utilizados por las BAL y se excretan al exterior y contribuyen al desarrollo del sabor, aroma y textura de los alimentos, además de proporcionar estabilidad inhibiendo tanto a microorganismos patógenos, como a microorganismos causantes de deterioro (Requena y Peláez, 1995). El mecanismo de acción de éste tipo de ácido ya se mencionó en la sección 4.6.1. Las BAL pueden sobrevivir y desarrollarse en presencia de un pH relativamente bajo debido a que poseen un sistema de transporte simultáneo de ácido láctico y de protones al exterior celular, que además de contribuir a la homeostasis del pH interno, origina energía (Requena y Peláez, 1995).

### 3.7.3. Peróxido de hidrógeno

Las bacterias lácticas producen peróxido de hidrógeno como mecanismo de protección frente al oxígeno mediante la acción de oxidasas o NADH peroxidasas. El  $H_2O_2$  se acumula en el medio, debido a que las BAL no poseen la enzima catalasa (Daeschel, 1989; Requena y Peláez, 1995; Caplice y col., 1999). El efecto antibacterial del peróxido, se atribuye a su efecto altamente oxidante, mediante la peroxidación de los lípidos de la membrana, lo cual genera cambios irreversibles en la membrana celular (Vanderbergh, 1993; Requena y Peláez, 1995).

El peróxido de hidrógeno puede reaccionar con otros componentes para formar sustancias inhibitorias, como por ejemplo el sistema lactoperoxidasa (SLP). En leche cruda, el peróxido de hidrógeno generado por las bacterias lácticas puede reaccionar con el tiocianato endógeno el cual es catalizado por la lactoperoxidasa para formar productos de oxidación intermediarios inhibitorios para ciertos microorganismos (Daeschel, 1989).

### 3.7.4. Diacetilo

El diacetilo (2,3-butanodiona) es producido por las BAL fermentadoras de citrato y es el responsable del aroma y sabor de la mantequilla y algunos otros productos lácteos fermentados. El diacetilo puede ser producido por muchas BAL incluyendo cepas de *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* y *Lactobacillus* (Caplice y col., 1999). Su acción antibacteriana es mayor contra microorganismos Gram-negativos, levaduras y hongos. Desactiva por bloqueo o por modificación de la zona catalítica a enzimas microbianas tales como alcohol deshidrogenasa, adenilato ciclasa, glutamato deshidrogenasa, y transcetolasa (Requena y Peláez, 1995).

Aunque el diacetilo es generalmente conocido como seguro (GRAS), su utilidad en alimentos es limitada debido que se necesitan elevadas concentraciones. Su intenso aroma podría excluir

su uso en alimentos, sin embargo, podría ser empleado como desinfectante de utensilios y superficies de trabajo debido a su alta volatilidad (Daeschel, 1989).

### 3.7.5. Reuterina

La reuterina o  $\beta$ -hidroxipropionaldehído es una sustancia de bajo peso molecular, altamente soluble, producida por las especies heterofermentativas de *Lactobacillus ruterii* (Daeschel, 1989) proveniente del tracto gastrointestinal y de los productos cárnicos. Es un metabolito asociado al metabolismo del glicerol. Tiene un amplio espectro de inhibición contra *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida* y contra algunos protozoarios e incluso contra virus. La reuterina actúa inhibiendo la enzima ribonucleótido reductasa, que cataliza el primer paso en la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN) (Daeschel, 1989; Requena y Peláez, 1995; Caplice y col, 1999).

### 3.7.6. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son sustancias de origen proteico biológicamente activas que producen efectos antagonistas intraespecie (Klaenhammer, 1988; Vandenberg, 1993; McMullen y Stiles, 1996). Son pequeñas proteínas catiónicas (30-60 residuos de aminoácidos) con altos puntos isoeléctricos y con características anfipáticas (Bruno y Montville, 1993).

### 3.7.6.1. Clasificación

Las bacteriocinas se clasifican con base en su espectro de actividad, estructura, modo de acción bactericida, y la presencia de receptores sobre la superficie de la célula para la adhesión (Tabla 3.12) (Klaenhammer, 1993; Vandenberg, 1993; McMullen y Stiles, 1996).

Las bacteriocinas de las clases I y II son las más estudiadas debido a que son las más abundantes en la naturaleza (Hugas, 1998). Las bacteriocinas del grupo I contienen 4 aminoácidos como comunes dehidroalanina, dehidrobutirina, lantionina y  $\beta$ -metil lantionina. Estos aminoácidos son producidos por modificación postranslacional de la serina y la treonina para formar dehidro aminoácidos. Los dehidro-aminoácidos reaccionan con la cisteína para formar anillos de lantionina tioéter (Klaenhammer, 1988; Vandenberg, 1993; Montville y Winkowski, 1997).

Las bacteriocinas del grupo II son un grupo grande de pequeñas proteínas estables con una secuencia principal que contiene Gly+Gly<sup>-1</sup>- Xaa<sup>+1</sup>. Este grupo está dividido en tres subgrupos. En el subgrupo IIa se encuentran aquellas bacteriocinas contra *L. monocytogenes*. La pediocina PA-1, sakacina A y la leucocina P, leucocina A, bavaricina MN, y la curvacina A son algunos ejemplos de este grupo y requieren de dos péptidos diferentes para activarse. Las bacteriocinas del grupo II, como la lactacina B requieren cisteínas reducidas para activarse (Montville y Winkowski, 1997). Finalmente, las bacteriocinas del grupo III, son proteínas lábiles al calor, ejemplos helvecina J y V y lactacina A y B (Klaenhammer, 1988; Vandenberg, 1993; Montville y Winkowski, 1997).

Tabla 3.12. Clasificación de las bacteriocinas con base en su estructura (Según Nes y col., 1996)

Clase	Características
<b>I o Lantibióticos</b> Tipo A: Elongadas  Tipo B: Globulares	Pequeños péptidos (<5 kDa) con actividad antibiótica, contienen los aminoácidos inusuales lantionina, $\beta$ -metil lantionina, dehidroaminoácidos y tioeter aminoácidos. Ej.: nisina, lacticina 481, carnocina U149 y lactocina S.
<b>II o No lantibióticos</b> IIA: <i>Listeria</i> activos IIB: Dos péptidos IIC: Sec dependiente IID: No perteneciente a las anteriores	Tienen un tamaño < 10k Da, se dividen en tres subclases con base en su secuencia N- terminal, formación de biocomponentes, o la presencia de grupos funcionales sulfhidrilo. Son Estables al calor. Ej.: pediocina PA-1, lactococcina A, B,M,leucocina A, sakacina A, curvacina A, sacacina P y lactacina F. Existen 3 subgrupos.
<b>II o lábiles al calor</b>	Tamaño > 30 kDa, incluye principalmente enzimas bacteriolíticas extracelulares. Ej. helveticina V-1829, lactacinas A y B.

### 3.7.6.2. Características y modo de acción

Las bacteriocinas son compuestos de naturaleza proteica y se inactivan por proteasas incluyendo aquellas de origen pancreático (tripsina y  $\alpha$ -quimiotripsina) y de origen gástrico como la pepsina. Se inactivan durante su paso por el tracto gastrointestinal, sin ser absorbidos como compuestos activos. Algunas bacteriocinas también se inactivan por tratamiento térmico equivalente a la pasteurización y son estables a pH neutro (Lloyd y Draque, 1975; Martínez y col., 2000). Las bacteriocinas pueden inhibir a ciertos microorganismos ya que afectan la permeabilidad de la membrana por medio de la formación de canales y poros, ocasionando con ello una pérdida de ciertas moléculas, entre ellas  $K^+$  y ATP. Este agotamiento en las reservas energéticas conduce a la disminución de síntesis de macromoléculas llevan finalmente a la muerte celular (Vandenbergh, 1993).

Las bacterias que producen a las bacteriocinas son inmunes a sus propias bacteriocinas. Son activas contra grupos bacterianos taxonómicamente relacionados (Gram-positivas) y

generalmente no inhiben bacterias Gram negativas, hongos y levaduras. Sin embargo, existen bacteriocinas, entre ellas la nisina, las cuales presentan un espectro de actividad más amplio (Vandenberg, 1993).

**Tabla 3.13** Características de las bacteriocinas producidas por *Lactococcus spp.* (Requena y Peláez, 1995)

Bacteriocina	Micoorganismo productor	Espectro de inhibición	Características
Nisina	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>Lactis</i>	Bacterias Gram positivas	3500 Da, Termoestable (100°C, 10 min) Resistente a pronasa, tripsina y pepsina Sensible a quimiotripsina y pancreatina Estable a pH ácido, hasta pH6.8. Determinantes genéticos codificados en un transposón conjugativo (70 kb)
Lacticina 481	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CNRZ 481	Bacterias lácticas <i>Cl. tyrobutyricum</i>	2900 Da, Termoestable (100°C, 60 min) Sensible a quimiotripsina, pronasa, proteinasa K y cuajo. Determinantes genéticos transmisibles por conjugación.
Diplococina	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> 346	<i>Lactococcus spp.</i>	5300 Da, termoestable (100°C, 60 min) a pH 5.0 sin purificar. Sensible a quimiotripsina, tripsina pronasa y pepsina. Determinantes genéticos en plásmido (83kb)
Lactostrepcina S	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> y <i>cremoris</i>	<i>Lactococcus spp.</i> <i>Streptococcus spp.</i> <i>L. helveticus</i> <i>Leuconostoc spp.</i>	Estables a 121°C, 10 min y al a pH inferior a 5. Sensibles a tripsina, pronasa, quimiotripsina y lipasas.
Lactococina A	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> y <i>cremoris</i>	<i>Lactococcus spp.</i>	3400 Da, termoestable (100°C, 30 min) Sensible a tripsina. Determinantes genéticos en plásmidos,
Lactocinas B y M	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> 9B4	No determinado	Determinantes genéticas en plásmido (60kb)

#### 3.7.6.4. Nisina

El término nisina describe a una familia de moléculas polipeptídicas con carácter inhibitorio producidas por *Lactococcus lactis subs lactis* (Vandenbergh, 1993). La nisina pertenece a la clase Ia y es la bacteriocina mejor caracterizada. Puede existir en formas multiméricas. La nisina A contiene una histidina en la posición 27, mientras que la nisina Z tiene una aspargina (Vandenbergh, 1993; Montville y Winkowski, 1997). (Tabla 3.13).

#### 3.7.6.4. Aplicación de bacteriocinas en carne y productos cárnicos

Muchas bacteriocinas han sido aisladas a partir de carne y productos cárnicos (Tabla 3.14). Sin embargo, las bacteriocinas más estudiadas en la carne y los productos cárnicos son la nisina A, P y K, también la leucocina y la pediocina PA-1/AcH (Hugas, 1998).

Aunque la nisina es la bacteriocina más estudiada, su aplicación en los productos cárnicos es limitada debido a su baja solubilidad, su difícil distribución y la falta de estabilidad. Además, la dosis requerida para ser efectiva no es costeable y excede la ingesta diaria permitida de 100g/día (Hugas, 1998). Sin embargo la nisina empleada en forma de atomizador (Ambicin<sup>R</sup> 5,000 AU/mL) ha sido empleada para la descontaminación de superficies de carne. La combinación de nitritos y 1,000-10,000 UI/g de nisina fue efectivo contra de *Clostridium* y algunas otros microorganismos Gram-positivos patógenos tales como *Listeria* y *Staphylococcus* en salchichas de cerdo y carne cruda (Stiles, 1996; Hugas, 1998).

225560

**Tabla 3.14.** Cepas bacteriogénicas productoras de bacteriocinas clase II aisladas a partir de carne y productos cárnicos (Hugas, 1998)

Microorganismo	Bacteriocina	Fuente	Espectro antibacterial
<i>Pd. acidilactici</i> PAC1.0 <i>Pd. acidilactici</i> JD, H, E.F.M.	Bacteriocina PA-I	Embutidos fermentados estilo americano y español.	<i>Pediococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Cl. bulinum</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> .
<i>Ent. faecium</i> CTC492 <i>Ent. faecium</i> DCP1146	Enterocina A Enterocina 1146	Embutidos poco fermentados. Productos lácteos	Otros <i>Lactobacillus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>C. divergens</i> , <i>Ent. faecalis</i> y <i>C. perfringens</i> .
<i>Leu. Gelidum</i> A-UAL187 <i>Leu. mesenteriodes</i> TA33a	Leucocina A-UAL Leucocina TA33a	Carnes frías almacenadas al vacío.	BAL, <i>L. monocytogenes</i> , <i>Ent. faecium</i> , <i>Leu. carnosum</i> B-TA11.
<i>C. piscicola</i> KLV1/B	Carnobacteriocina B1 y B2	Carne envasada al vacío	Activa contra otras carnobacterias, <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Listeria</i> y <i>Enterococcus</i> .
<i>C. Piscicola</i> JG126	psicolina 126	Jamón	Fuerte actividad antiliseria
<i>L. curvatus</i> FS47 <i>Lb. brevis</i> SB27	curvaticina FS47 brevicina 27	carne de vaca picada Embutidos fermentados	<i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Enterococcus</i> y <i>Bacillus</i> . <i>Lactobacillus</i> y <i>pediococcus</i> .
<i>P.d. acid ilactic</i> L50	pediocina L50	embutidos españoles fermentados	<i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Propionic bacteria</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>C. botulinum</i> , <i>Listeria</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>C. divergens</i>	divergicina 750	Carne empacada al vacío	<i>Carnobacterium</i> , <i>Entrococcus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>C. perfringens</i>

La pediocina PA-I/AcH es otra bacteriocina producida por *P. acidilactici* que, aunque no ha sido aprobada para su uso en alimentos (Stiles, 1996), se sabe tiene un gran potencial por su actividad antilistérica y podría ser empleada en carne y productos cárnicos. *P. acidilactici* no es un microorganismo nativo en la carne y no es capaz de crecer a temperaturas de refrigeración, pero podría ser empleado en condiciones de abuso de temperaturas (Hugas, 1998).

Existe un proceso llamado Wisconsin que consiste en la adición de carbohidratos y *P. acidilactici* como cultivo iniciador que ha sido adaptado para su uso en alimentos refrigerados

de baja acidez tales como ensalada de pollo a pH 5.1 (Stiles, 1996). En estudios realizados con *Clostridium botulinum* se observó que la presencia de una cepa de *P. acidilacti* inhibió la formación de la toxina producida por *C. botulinum* (Stiles, 1996; Hugas, 1998).

*Lb. sake* CTC494 han sido empleado para inhibir exitosamente el desarrollo de *Listeria* en productos cárnicos frescos, productos cárnicos cocidos y embutidos fermentados (Aymerich y Hugas, 1998). Por otra parte, también fue capaz de inhibir a *Listeria innocua* en jamón cocido refrigerado, aves y carne picada almacenados durante 7 días (Hugas, 1998).

Existe un número considerable de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas que inhiben a *Listeria monocytogenes*. Sin embargo, la cantidad de ácido producida puede ocasionar deterioro. Así *Carnobacterium*, la cual produce menos ácido podría tener grandes aplicaciones (Campos y col., 1997). En estudios realizados por Campos y col. (1997), encontraron que a bajas temperaturas la producción de bacteriocinas aumentó la inhibición de *Listeria monocytogenes* por *C. piscicola*

#### 3.7.6.5. Consideraciones para el empleo de bacteriocinas en alimentos

Las bacterias lácticas productoras y no productoras de bacteriocinas así como las bacteriocinas purificadas o semipurificadas, tienen un gran potencial en la conservación de los alimentos de una manera más higiénica y saludable, además, tienen el estatus GRAS (Stiles, 1996). Sin embargo, el empleo de bacteriocinas purificadas o semipurificadas podría representar ciertos problemas y limitaciones, entre las que se encuentra el riesgo de favorecer el desarrollo de flora resistente a bacteriocinas (McMullen y Stiles, 1996). Por otra parte el efecto antagonista puede ser limitado o incluso nulo en la carne debido a la presencia de las proteasas endógenas o por la unión a proteínas y grasas, lo cual causa la pérdida de actividad de las bacteriocinas. Además, puede haber antagonismo con otras bacterias e inhibición por bacteriófagos (Stiles, 1996). En este sentido, se recomiendan utilizar cepas bacteriogénicas y/o

bacteriocinas aisladas de su propio habitat, más adaptadas y más competitivas de acuerdo con el producto (McMullen y Stiles, 1996; Aymerich y Hugas, 1998).

Otra limitante de las bacteriocinas es su estrecho espectro de inhibición, además no son activas en contra de bacterias Gram-negativas como *Salmonella*. No obstante, diferentes tratamientos han sido empleados para que los microorganismos Gram-negativos sean sensibles a las bacteriocinas, especialmente, la nisina. El empleo de nisina con agentes quelantes (EDTA, Tween 80, Triton -X, 100) amplía el espectro antibacterial de la nisina a las bacterias Gram-negativas ( Stiles, 1996; Hugas, 1998). Otros métodos tales como el “shock “ osmótico, altas presiones hidrostáticas y pulsos eléctricos en presencia de nisina o pediocina, han causado la pérdida de viabilidad y daños sub-letales a células de *L.monocytogenes* Scott A, *E. coli* 0157:H7 y *Salmonella typhimurium* M1 (Hugas, 1998).

Con respecto a los cultivos bacteriogénicos, estos pueden tener un efecto positivo sobre la población de microorganismos Gram-negativos estableciéndose como flora dominante y desplazándolos. Finalmente, el efecto de las bacteriocinas y los cultivos bioprotectores podría ser más efectivo si se emplea la “ tecnología de barreras”, es decir cultivos bioprotectores en conjunción con otros factores como la actividad de agua, pH, temperatura, aplicación de pulsos eléctricos y altas presiones (Hugas, 1998; Stiles, 1996).

---

## **4. OBJETIVOS**

## 4.1 Objetivo General

- Estudiar el efecto del empleo de cultivos bioprotectores y nisina sobre la calidad microbiológica y fisicoquímica de la carne de pollo almacenada en condiciones de abuso de temperatura.

## 4.2 Objetivos Particulares

- Seleccionar concentración y tipo de fuente de carbono que se adicionará a los distintos inóculos, con base en la reducción del pH y acidez total titulable del músculo de pollo.
- Evaluar el efecto del empleo de cultivos bioprotectores o nisina sobre las poblaciones de microorganismos indicadores: *Pseudomonas*, *Listeria* y coliformes totales en el músculo de pollo.
- Evaluar el efecto del empleo de cultivos bioprotectores o nisina en la producción de aminas biogénicas en el músculo de pollo.
- Evaluar el efecto del empleo de cultivos bioprotectores o nisina sobre algunos parámetros de calidad de la carne como son capacidad de retención de agua, textura, color e integridad de las proteínas miofibrilares.

---

## ***5. MATERIALES Y MÉTODOS***

---

La metodología empleada para estudiar el efecto del empleo de cultivos bioprotectores y nisina sobre la calidad del músculo de pollo se encuentra dividida en las siguientes secciones:

- I. Selección de cultivos bioprotectores (CB).
  
- II. La selección de la concentración y tipo de fuente de carbono
  
- III. Estudio del efecto del empleo de cultivos bioprotectores (*Lactococcus lactis* sbsp *lactis* ATCC 11454 y *Staphylococcus carnosus* MC-1-02055) y nisina sobre la población de microorganismos indicadores en muestras inoculadas con *Pseudomonas fluorescens* C65, *Escherichia coli* ATCC 8937 (no patógena) y *Listeria innocua* ATCC 33090
  
- IV. Efecto del empleo de cultivos bioprotectores y nisina sobre la producción de aminas biogénicas en muestras inoculadas con cultivos (a) bioprotectores o nisina y (b) cultivos bioprotectores o nisina y microorganismos indicadores (*Escherichia coli* o *Pseudomonas fluorescens*).
  
- V. El estudio del efecto del empleo de cultivos bioprotectores y nisina sobre algunos parámetros de calidad de la carne de pollo: pH, acidez total titulable (ATT), producción de ácidos orgánicos, capacidad de retención de agua (CRA), textura, integridad de las proteínas miofibrilares y color.

## 5.1 Selección de cultivos bioprotectores y nisina

Con el fin de mejorar la calidad microbiológica de la carne de pollo se emplearon por separado dos cultivos bioprotectores y una bacteriocina:

- a) Cepa no productora de bacteriocinas: *Staphylococcus carnosus* MC-1-02055 (Ch.Hansen).
- b) Cepa productora de bacteriocinas: *Lactococcus lactis* subsp *lactis* ATCC 11454 (Ch.Hansen) (Vandenberg, 1993).
- c) Bacteriocina comercial: nisina 12.5 mg/L (Sigma Chem. Co. Louis, MO E.U.A)) (Hugas, 1998)

*Staphylococcus carnosus* es una bacteria nativa de la carne la cual tiene la capacidad de producir ácido láctico (Holt y col., 1994) y por lo tanto de reducir el pH. Se emplea en la elaboración de productos cárnicos fermentados a bajas temperaturas (Ricke y Keeton, 1997). *Staphylococcus carnosus* MC-1-02055 ha sido empleado exitosamente como cultivo bioprotector sobre la superficie de la carne de cerdo (Minor, 1998).

*Lactococcus lactis* además de producir ácido láctico como principal metabolito (Alxesson, 1993) es productor de nisina y por lo tanto su espectro de inhibición podría ser más amplio comparado con *S. carnosus*. Por otra parte, *Lactococcus lactis* no puede crecer a temperaturas de refrigeración (McMullen y Stiles, 1996), sin embargo, podría ser de utilidad como cultivo bioprotector sobre sustratos musculares almacenados en condiciones de abuso de temperatura ya que es capaz de crecer a 10°C (Alxesson, 1993).

La nisina actualmente se ha empleado para mejorar la calidad microbiológica de una gran variedad de productos entre ellos canales de pavo (Mahadeo y Tatini, 1994), tocino, salchichas de pollo (Vandenbergh, 1993) y queso manchego (Rodríguez y col., 1997), etc. En este caso únicamente se experimentará con una concentración de 12.5 mg/L (Hugas, 1998). El empleo de nisina a diferencia del empleo de los cultivos bioprotectores podría representar ciertas ventajas sobre las características fisicoquímicas de la carne debido a una menor disminución del pH.

Finalmente, todas las bacterias lácticas empleadas en este estudio se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  en una mezcla de medio MRS y glicerol al 20%. Antes de realizar alguna prueba o fermentación se realizaron dos resiembras (1% v/v) y se incubaron a  $30^{\circ}\text{C}$  por 18 horas.

### 5.1.1 Ensayo de la prueba de actividad de cepa productora de bacteriocinas

Para confirmar la capacidad bacteriogénica de *Lactococcus lactis* subs. *lactis* ATCC 11454, se empleó el método de difusión en placas de agar (Bhunja y col., 1998).

#### 5.1.1.1 Preparación del extracto libre de células de la cepa productora

A partir de un cultivo de 18 horas al 1% incubado a  $30^{\circ}\text{C}$ , las células se separaron por centrifugación en una centrífuga Beckman (Palo Alto, California, E.U.A.) a 12100 g durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente el pH del sobrenadante se ajustó entre 5.8-5.9 con NaOH 1 N y se esterilizó por filtración con una membrana de 0.2  $\mu\text{m}$ . Finalmente, dado que en este caso lo único que nos interesaba era verificar la producción de bacteriocinas por parte de *Lactococcus lactis* se realizaron diluciones sucesivas de 1:10 y no de 2 en 2 como sugiere la literatura (Harting, 1972).

### 5.1.1.2 Preparación de la cepa sensible

El único método estándar que existe para cuantificar la actividad de la nisina (en este caso producida por *Lactococcus lactis* subs. *lactis* ATCC 11454), sugiere el empleo de *Micrococcus luteus* como microorganismo indicador (Bhunja y col., 1988). Sin embargo, como sólo interesa probar la capacidad bacteriogénica de la cepa productora de bacteriocinas, se empleó como cepa sensible una bacteria aislada a partir de chorizo, la cual se presume que es una cepa de *Enterococcus faecalis* (Kuri, 1998). La cepa sensible se inoculó sucesivamente en medio MRS al 1% a las 8, 18 y 2 horas a 30°C. Transcurrido este tiempo, se tomaron 70 µL de la dilución  $10^{-2}$  para inocular 10 mL de agar suave (0.8%).

### 5.1.1.3 Prueba de producción de bacteriocinas

Sobre 10 mL de medio MRS (agar 1.5%) se colocó una sobrecapa de 8 mL de medio MRS suave (0.8% agar) inoculado con la cepa sensible (Sección 5.1.1.2). Después las placas se colocaron a 4°C para permitir la solidificación de agar; posteriormente se realizaron los pozos. Cada pozo se llenó con 25 µL del extracto libre de células. Posteriormente, las placas se colocaron a temperatura ambiente durante media hora con el fin de permitir la difusión del extracto y después se incubaron a 30°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, la capacidad bacteriogénica se determinó midiendo el diámetro del halo de inhibición producido por la dilución  $10^{-1}$ / mg de proteína.

**225560**

#### 5.1.1.4 Sensibilidad frente a proteasas

Este paso se realizó para corroborar la naturaleza proteica del compuesto antimicrobiano producido por la cepa de *Lactococcus lactis* empleada. La destrucción de la bacteriocina se verifica mediante una disminución o la no formación de los halos de inhibición. Para ello, a 800  $\mu\text{L}$  del extracto enzimático libre de células se le adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de solución de proteinasa K o  $\alpha$ -quimotripsina (10 unidades/mL) (Sigma Chem. Co. Louis, MO E.U.A) (Tabla 5.1) durante 15 minutos (Tabla 5.1). Para inactivar las proteasas, se adicionaron 0.2 mL de ácido tricloroacético al 5%. Como control se empleó el extracto celular sin adición de proteasas. Finalmente, la pérdida de la actividad de la bacteriocina se determinó midiendo el diámetro de los halos de inhibición. Además, se determinó la cantidad de proteína soluble por el método de Lowry (1951).

**Tabla 5.1.** Condiciones de incubación empleadas por las proteasas empleadas para probar la sensibilidad de *Lactococcus lactis* subs. *lactis* ATCC 11454

Enzima	pH óptimo	Tiempo de incubación (min.)	Temperatura (°C) de incubación
Proteinasa K	7.5	15	37
	7.5	15	25
Quimotripsina			

## 5.2 Selección del tipo y concentración de fuente de carbono

En esta sección se realizó la selección de la concentración y tipo de fuente de carbono (Tabla 5.2) que se adicionaría a los distintos inóculos para favorecer el crecimiento de las bacterias lácticas e inducir la fermentación láctica sobre la superficie de la carne de pollo sin que esto ocasionara grandes cambios en el pH así como en la acidez total titulable (ATT).

**Tabla 5.2.** Variables y niveles empleados para la selección del inóculo, fuente y concentración de carbono.

Variables	Niveles	Niveles
Inóculo	3	Testigo (Sin inóculo) <i>Lactococcus lactis</i> subs. <i>lactis</i> ATCC 11454 <i>Staphylococcus carnosus</i> MC-1-02055
Fuente de carbono	2	Glucosa Sacarosa
Concentración de Fuente de carbono	5	0, 2.5, 5, 7.5 y 10%

### 5.2.1 Preparación de los inóculos cultivos bioprotectores

Antes de iniciar cualquier ensayo los cultivos bioprotectores se resembraron dos veces (1% v/v) en caldo MRS (Difco, Detroit, Mich., EUA) y se incubaron a 30°C por 18 horas. Posteriormente, se inocularon de manera individual en matraces de 250 mL en caldo MRS a 30°C, hasta que la suspensión de células alcanzó una densidad óptica de 1 medida a 600 nm (Ramírez y col., 1994) en un espectrofotómetro Beckman DU modelo 650 (Palo Alto,

California, E.U.A). A continuación, a esta suspensión celular se le adicionó como fuente de carbono ya sea glucosa o sacarosa a distintas concentraciones, tal y como se muestra en la tabla 5.2.

### 5.2.2 Preparación e inoculación del músculo fresco de pollo

Durante todos los experimentos se empleó el músculo *Pectoralis* (pechuga) de pollo, el cual se obtuvo en el área del sacrificio inmediatamente después de la evisceración, en la procesadora de pollo “Los Hacendados”, localizada en el municipio de Texcoco, Estado de México.

Al músculo *Pectoralis* se le eliminó piel y huesos y se cortó en porciones de 50 g, aproximadamente. Posteriormente, la carne se inoculó por inmersión durante 10 minutos a temperatura ambiente en una suspensión celular que contenía aproximadamente  $10^8$  ufc/mL de *Lactococcus lactis* subs. *lactis* ATCC 11454 o *S. carnosus* MC-1-0205, la cual se preparó como en el inciso anterior (5.2.1). A continuación, las muestras se dejaron drenar durante 30 segundos para eliminar el exceso de suspensión. El testigo se preparó de igual forma que los inóculos pero sin la adición de cultivos bioprotectores. Todas las pruebas se realizaron por duplicado.

### 5.2.3 Empacado y almacenamiento

Las muestras se empacaron al vacío en bolsas Cryovac LB-50 en una empacadora Multivac D-8941(Koch, Kansas, E.U.A.) y se almacenaron a  $10 \pm 2^\circ\text{C}$  por 8 días., durante los cuales se analizaron el pH y la acidez total titulable.

#### 5.2.4. Determinación de pH y acidez total titulable (ATT)

La reducción excesiva del pH por parte de los cultivos iniciadores puede afectar las características sensoriales de la carne (McMullen y Stiles, 1996). Es por ello que tanto el pH como la ATT se monitorearon a los 0,2,4,6 y 8 días de almacenamiento.

##### a) Determinación de pH (Guerrero y Arteaga 1990)

A 10 g de muestra de carne fermentada de pollo se le añadieron 100 mL de agua destilada. Posteriormente se realizó una homogenización durante 1 minuto en una licuadora doméstica. La mezcla de carne obtenida se filtró a través de una manta de cielo para eliminar el tejido conectivo y finalmente se midió el pH del filtrado en un potenciómetro Beckman (Palo Alto California, E.U.), modelo pH  $\Phi$  50.

##### b) Acidez total titulable (ATT) (Guerrero y Arteaga 1990)

Se homogeneizaron 10 g de muestra de músculo de pollo con 200 mL de agua destilada. Después de 1 minuto la mezcla obtenida se filtró a través de una manta de cielo. El filtrado se aforó a 250 mL con agua destilada. A continuación a 25 mL de esta solución se le adicionaron 75 mL de agua destilada y se realizó una titulación con NaOH 0.01N usando fenolftaleína como indicador. Finalmente, la ATT se reportó como % ácido láctico empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Acido láctico} = \frac{V_{\text{NaOH}} \times N_{\text{NaOH}} \times \text{Meq}_{\text{Acido láctico}} \times f \times 100}{\text{Peso de la muestra}}$$

En donde:

V=volumen,

N= normalidad

f=  $\frac{\text{mL aforado (250 mL)}}{\text{Alícuota (25 mL)}}$

### 5.3. Efecto del empleo de cultivos bioprotectores y nisina sobre la población de microorganismos indicadores

En esta sección el músculo de pollo se inoculó por inmersión con una suspensión celular que contenía una mezcla de un cultivo bioprotector o nisina (12.5 mg/L) y un microorganismo indicador (Figura 5.2).

#### 5.3.1. Preparación de los inóculos

La preparación de los cultivos bioprotectores se llevó a cabo de igual manera que en el inciso 5.2.1. Por otra parte, la carne de pollo también se inoculó ya sea con *P. fluorescens* C65, *E. coli* ATCC 8937 o *L. innocua* ATCC 33090. Estos microorganismos se inocularon en medio F (Anexo 1), caldo nutritivo y caldo de soya y tripticaseína adicionado con 0.6% de extracto de levadura, respectivamente hasta alcanzar una densidad óptica de 1 a 600 nm (Tabla 5.4). Posteriormente, los distintos inóculos se prepararon mezclando 90% de la suspensión celular que contenía a los cultivos bioprotectores (*Lactococcus lactis* o *S. carnosus*) o nisina ( $DO_{\lambda 600nm}=1$ ) o nisina y 10% de suspensión celular de *P. fluorescens* C65, *E. coli* ATCC 8937 o *L. innocua* ATCC 33090 ( $DO_{\lambda 600nm}=1$ ). De esta manera se obtuvieron los siguientes grupos de inóculos:

- I. Microorganismo bioprotector  $\approx 10^8$  ufc/mL o nisina + *P. fluorescens* C65,  $10^9$  ufc/mL.
- II. Microorganismo bioprotector  $\approx 10^8$  ufc/mL o nisina + *E. coli* ATCC 8937 (no patógena),  $\approx 10^8$  ufc/mL
- III. Microorganismo bioprotector  $\approx 10^8$  ufc/mL o nisina + *L. innocua* ATCC 33090,  $10^8$  ufc/mL.

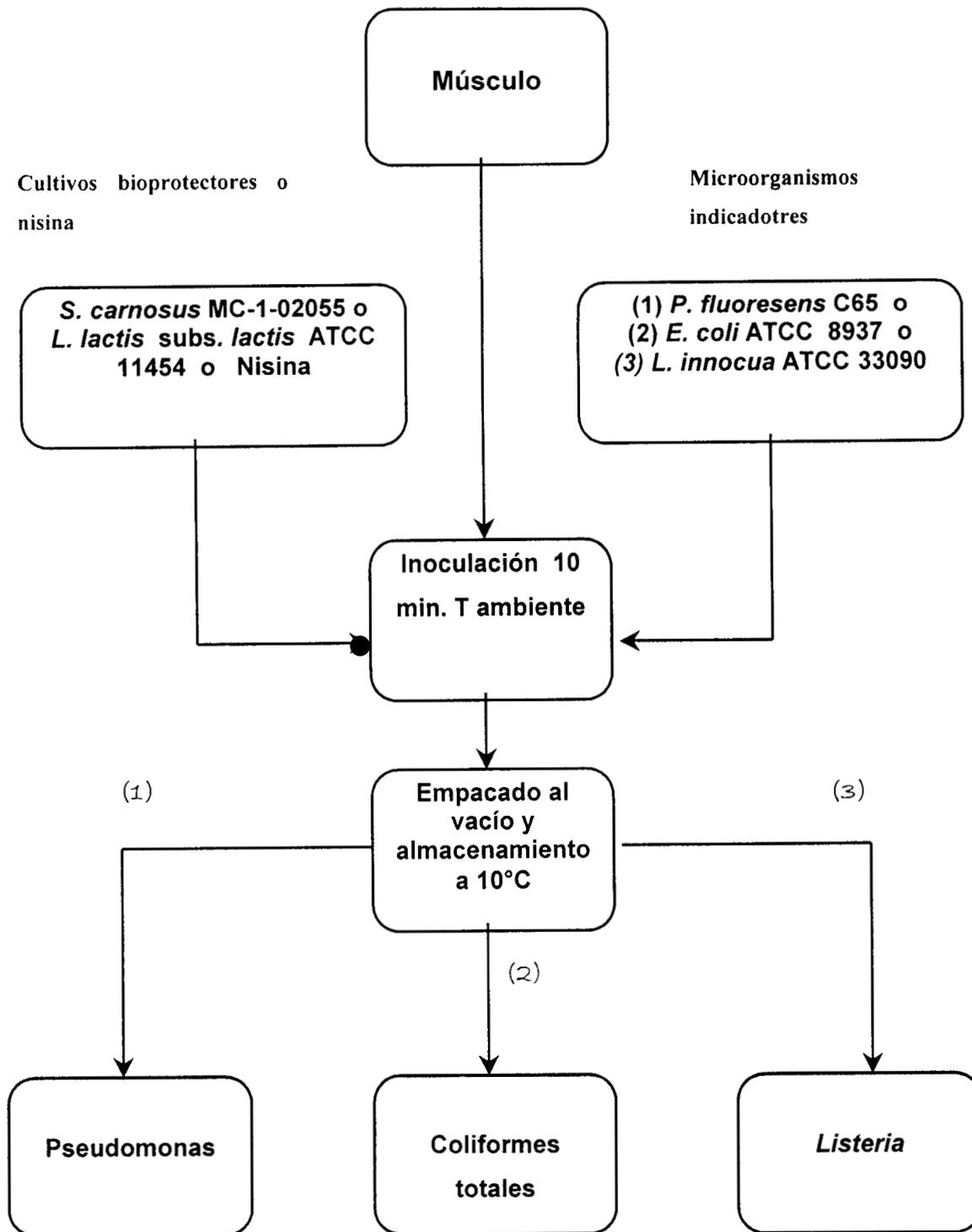
Todas las muestras control se prepararon de manera parecida pero sin adición de bacterias lácticas, es decir que únicamente se inocularon con el microorganismo indicador respectivo. Finalmente, todos y cada uno de estos inóculos se le adicionó 2.5 o 5% de sacarosa como fuente de carbono.

### 5.3.2. Inoculación del músculo de pollo

Aproximadamente 50 g del músculo *Pectoralis* (pechuga) de pollo fresco se inocularon por inmersión durante 10 minutos a temperatura ambiente en los inóculos preparados en el inciso anterior (Figura 5.1). Al igual que en el inciso 5.2.3, nuevamente todas las muestras se empacaron al vacío, se almacenaron a  $10 \pm 2^\circ\text{C}$  y se numeraron las poblaciones de *Pseudomonas*, coliformes totales o *Listeria* a diferentes intervalos de tiempo durante 8 días.

### 5.3.3. Cuenta de microorganismos

El recuento de las poblaciones de los microorganismos indicadores (figura 5.2) sobre la superficie de la carne de pollo se realizó por duplicado para todas las muestras durante los días 0,2,4,6 y 8. El muestreo se realizó sobre la superficie de la carne colocando un papel filtro Watman del No. 1 de 2 cm por lado durante 30 segundos. A continuación, el papel se retiró con unas pinzas estériles y se colocó en un tubo que contenía 36 mL solución salina, a esta dilución le llamamos  $10^{-1}$ . A partir de aquí se realizaron diluciones decimales. Finalmente, volúmenes de 0.1 mL se colocaron sobre los medios señalados en la tabla 5.5 para numerar la población de coliformes totales, *Pseudomonas* y *Listeria* (Anexo 1). Las placas empleadas para la numeración de coliformes totales y cuenta total se incubaron durante 24 horas a  $35^\circ\text{C}$ . Las placas empleadas para la numeración de *Listeria* se incubaron a  $30^\circ\text{C}$  por 48 horas, mientras que aquellas empleadas para numerar *Pseudomonas* se incubaron a temperatura ambiente (aprox.  $25^\circ\text{C}$ ) durante 48 horas (Tabla 5.3).



**Figura 5.1.** Diagrama para estudiar el efecto del empleo de cultivos bioprotectores y nisina sobre la población de microorganismos indicadores

Tabla 5.3. Microorganismos de importancia en la salud y causantes de deterioro empleados

Microorganismo	Importancia	Medio de cultivo para su propagación	Numeración de $\mu$ os indicadores
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8937 (no patógena)	Salud pública y deterioro	Caldo nutritivo	Agar bilis y rojo violeta (BRV) (Davis, 1951)
<i>Listeria innocua</i>	Salud pública	Caldo de soya y tripticaseína/ 0.6% de extracto de levadura	Caldo biotriptasa adicionado con 37.5g/L tiocianato de amonio ( ver Anexo 1)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> C65	Deterioro	Medio F	Agar GSP (Stainer y col, 1966)

## 5.4. Cuantificación de aminas biogénicas

La determinación de aminas biogénicas se realizó por duplicado tanto en las muestras inoculadas únicamente con bacterias lácticas como en aquellas inoculadas con una mezcla que contenía ya sea un cultivo bioprotector o nisina y *P. fluorescens* C65, *E. coli* ATCC 8937 o *Listeria innocua*.

### 5.4.1. Extracción y derivatización

La extracción de aminas se realizó con ácido tricloroacético (5%) y posteriormente una derivatización con cloruro de benzoílo ( Hwang y col., 1995) tal y como se muestra en el anexo 2.

### 5.4.2. Detección cromatográfica

El análisis de aminas biogénicas en las muestras se realizó mediante un sistema de cromatografía de líquidos alta resolución (HPLC) Waters (Waters, Milford, E.U.) equipado con una bomba 626 y detector de arreglo de diodos UV-VIS 994 integrados a un software Millennium Chromatography Manager v2.10 (Milipore Corp., Japan). Se empleó una columna de fase reversa Simmetry C-18 con una longitud de 3.9 x 150 mm y un tamaño de poro de 91Å (Waters, Milford, E.U). Finalmente, las muestras fueron eluidas a temperatura ambiente y empleando un gradiente de metanol del 55-100% (Anexo 2). El flujo empleado durante toda separación fue 0.5 mL/min, y el tiempo de corrida fue de 30 minutos. Finalmente, el cromatograma se obtuvo a 256 nm.

Como estándares se emplearon clorhidrato de triptamina, clorhidrato de putrescina, clorhidrato de cadaverina y clorhidrato de trimetilamina (Sigma Chem. Co. Louis, MO E.U.A). Las curvas patrón sólo se elaboraron para las aminas presentes en las muestras (Anexo 3).

### 5.5. Análisis de los parámetros de calidad

El empleo de cultivos bioprotectores y nisina puede ayudar a mejorar la calidad microbiológica de muchos alimentos. Sin embargo, es de esencial importancia que en la carne fresca el empleo de cultivos bioprotectores no altere algunos parámetros de calidad importantes para el consumidor. Se procedió a realizar el análisis de capacidad de retención de agua (CRA), textura, integridad de las proteínas miofibrilares y color, a varios intervalos de tiempo durante el almacenamiento en aquellas muestras inoculadas con cultivos bioprotectores o nisina.

---

### 5.5.1. Determinaciones de ATT, pH y producción de ácidos orgánicos del músculo de pollo inoculado con cultivos bioprotectores o nisina

Una vez seleccionados el tipo y la concentración de la fuente de carbono, se llevó a cabo la inoculación de la carne con cada uno de los cultivos bioprotectores o nisina (12.5 mg/L). Asimismo, se realizó el seguimiento del pH, ATT y producción de ácidos orgánicos a los 0,2,4, 6 y 8 días de almacenamiento. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

#### 5.5.1. Preparación de los cultivos bioprotectores y nisina

Una vez que se estableció que se emplearía como fuente de carbono sacarosa al 2.5 y al 5%, la preparación de los cultivos bioprotectores se llevó a cabo de igual manera que el inciso 5.2.1. Por su parte la nisina (Sigma Chem. Co. Louis, MO E.U.A) se preparó a una concentración de 12.5 mg/L (Hugas, 1998).

#### 5.5.2. Inoculación del músculo de pollo con cultivos bioprotectores o nisina

Las muestras se prepararon de igual manera que en los incisos 5.2.2, sólo que en este caso, además de inocular la carne por inmersión durante 10 minutos con una suspensión de cultivos bioprotectores (*Staphylococcus carnosus* MC-1-02055 o *Lactococcus lactis* subs. *lactis* ATCC 11454) y sacarosa (2.5 o 5%), se preparó otro lote de la misma manera que el testigo en el inciso 5.2.2 pero con la adición de la bacteriocina nisina (12.5 mg/L). Finalmente, las muestras se empacaron al vacío y se almacenaron a  $10 \pm 2$  °C durante 8 días.

#### 5.5.3. Determinación de pH y ATT

Las determinaciones de pH y acidez total titulable se realizaron de igual manera que en el inciso 5.2.4 a los 0,2,4,6 y 8 días de almacenamiento.

#### **5.5.4. Preparación de las muestras**

La preparación de los inóculos y la inoculación de las muestras se realizó de igual manera que en los incisos 5.2.1 y 5.2.2.

#### **5.5.5. Capacidad de retención de agua**

La capacidad de retención de agua se determinó a varios intervalos de tiempo durante el almacenamiento mediante el método de Price y Schweigert (1981) (Anexo 2).

#### **5.5.6. Cuantificación de ácidos orgánicos**

La determinación del pH y la acidez titulable (ATT) proporcionan una idea acerca del crecimiento de las bacterias lácticas, así como de la reducción del pH debido a la producción de algunos ácidos, incluyendo el ácido láctico. Sin embargo, una cuantificación más exacta de los ácidos orgánicos producidos durante la fermentación láctica puede verificarse mediante el empleo de cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC), por lo que se siguió el siguiente procedimiento

##### **5.5.6.1. Preparación de las muestras**

Las muestras de pollo fermentado se analizaron por duplicado a los 0, 4 6 y 8 días de almacenamiento. Para la extracción, se pesaron 5 gramos de muestra y se homogeneizaron durante 1 minuto con 20 mL de agua destilada en una licuadora doméstica. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 8000 g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtró y se aforó a 25 mL. Finalmente, volúmenes de 100 µL de esta solución se inyectaron a un HPLC para realizar la cuantificación de los ácidos orgánicos.

### 5.5.6.2. Condiciones cromatográficas

La cuantificación de los ácidos orgánicos se realizó en un sistema de cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) marca Waters (Milford, E.U.A.) equipado con una bomba 626 y detector de índice de refracción modelo 2410 acoplado al programa Milenium 2010. Se empleó una columna de intercambio iónico Sugar SH 1011 con dimensiones 300 x 0.8mm (Shodex<sup>R</sup>, Tokio, Japón).

Las condiciones cromatográficas isocráticas que se emplearon durante la separación se muestran en la tabla 5.4.

**Tabla 5.4.** Condiciones cromatográficas para el análisis de ácidos orgánicos

Parámetro	Valor
Temperatura columna	50°C
Temperatura del detector	50°C
Presión límite	900 psi
Flujo	1 mL/min
Tiempo de corrida	30 minutos
Eluyente	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.01N
Polaridad	Positiva

Como estándares se emplearon los ácidos láctico y acético (J.T.Becker, Phillipsburg, New Jersey, E.U.A.). Para determinar la cantidad de ácidos presentes en las muestras, se elaboraron las curvas patrón a partir de ácido láctico (0-12 mg/mL) y acético (0-70 µg/mL) (Anexo 3).

### 5.5.7. Textura

Las muestras se analizaron a diferentes tiempos durante el almacenamiento con un texturómetro TX-TX2 (Texture Technologies, Corp., Nueva York, E.U.A.) acoplado al software Texture Expert v1.2 (Stable Micro Systems, Ltd, Surrey, UK). Las muestras fermentadas se sometieron a un tratamiento térmico en baño María hasta alcanzar una temperatura interna de  $70 \pm 1^\circ\text{C}$ . Una vez concluida esta operación se dejaron enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se cortaron en forma de cubos de  $1\text{ cm}^3$ . Finalmente, se realizó una prueba de esfuerzo al corte en sentido perpendicular a las fibras musculares, empleando una navaja de Warner-Bratzler (Klettner, 1995). Los parámetros que se emplearon en esta prueba se muestran en la tabla 5.5.

**Tabla 5.5.** Parámetros empleados en la prueba de Warner-Bratzler

Parámetro	Valor
Forma de la muestra	Cúbica
Fuerza aplicada	5000 g
Tiempo	10 segundos
Velocidad	1 mm/s
Temperatura interna de la muestra	$70 \pm 1^\circ\text{C}$
Aplicación de la fuerza con respecto a las fibras musculares	Perpendicular

225560

### 5.5.8. Proteínas miofibrilares

Para estudiar el efecto de la fermentación láctica sobre el estado de las proteínas miofibrilares, en primer término se realizó la extracción mediante una precipitación fraccionada con cloruro de sodio a los días 4 y 8 por el método reportado por Samejima y Wolfe (1976), con ligeras

modificaciones (ver Anexo 2). La hidrólisis de las proteínas se evaluó mediante electroforesis desnaturante (SDS-PAGE) por el método de Laemmli (1970), con 4% T de acrilamida para el gel de concentración y 10% de acrilamida para el gel de separación. Para ello, se empleó una cámara de electroforesis Mini Protean II Modelo 1000/500 (Bio Rad, Richarmond, V.a. E.U.A.) con un voltaje constante de 200 V. Los geles se fijaron y se tiñeron durante 1 hora en una solución de azul de Coomasie al 0.2%, metanol al 40 % y ácido acético glacial 10 %. Posteriormente, los geles se destiñeron durante toda la noche con una solución de metanol al 40% de y ácido acético glacial al 10%. Se empleó un marcador de pesos moleculares de amplio rango (205-6.5 kDa) (Sigma Chem. Co. Louis, MO E.U.A) en donde las proteínas estándar fueron Miosina (205 kDa),  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* (116 kDa), seroalbúmina (66 kDa), Ovoalbúmina (45 kDa), Anhidrasa carbónica (29 kDa), Inhibidor de tripsina (20.1 kDa),  $\alpha$ -Lactoalbúmina (14.2kDa) y Aprotinina (6.5 kDa) (Bio-Rad, Richarmond , California). Finalmente, los geles se analizaron en un Image Master Total Lab (Amersham Pharmacia Biotech., Uppsala, Suiza) en donde se escanearon en un scanner-18 1134 (Win NT) y posteriormente se analizaron empleando el software Image Master1D (Amersham Pharmacia Biotech., Uppsala, Suiza).

### 5.5.9. Determinación de color

Para evaluar el efecto de la fermentación láctica sobre el color se empleó un colorímetro Hunter Lab modelo 11491, *Color Flex* (Reston , Va) por el método de Little (1975) (citado por Pérez-Chabela, 1998). Los estándares empleados fueron  $L=94.35$ ,  $a=1.0$   $b=1.9$ . Por su parte las muestras (preparadas de igual manera que en 5.2.1 y 5.2.2) se analizaron por triplicado rotando el portamuestras  $90^\circ$  en cada lectura. A continuación, los valores de  $L$ ,  $a$ , y  $b$ , se transformaron a coordenadas polares con el fin de obtener los valores de cromaticidad y tonalidad de acuerdo con las siguientes fórmulas:

---

$$\text{Tonalidad} = \tan^{-1} b/a$$

$$\text{Cromaticidad} = (a^2 + b^2)^{1/2}$$

### 5.6. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron en el paquete estadístico SPSS versión 8.0 mediante un modelo lineal de covarianza y ANOVA, así como una prueba de Duncan para la comparación múltiple de medias.

---

## ***6. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS***

## 6.1 Verificación de la capacidad bacteriogénica de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* ATCC 11454

El extracto libre de células obtenido a partir de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 presentó sensibilidad frente a la cepa de *Enterococcus faecalis* mediante la formación de halos de inhibición. La ventaja de emplear a *Enterococcus faecalis* como cepa sensible radica en el hecho de que se trata de una bacteria aislada a partir de un sustrato muscular, por lo tanto *L. lactis* podría inhibir este tipo de bacterias de hallarse presente sobre el músculo de pollo.

### 6.1.1 Sensibilidad frente a enzimas proteolíticas

Para probar que la inhibición producida por *L. lactis* contra la cepa 133 era causada por compuestos de origen proteico, se determinó la sensibilidad de compuesto producido por *L. lactis* frente a la acción de proteasas  $\alpha$ -quimotripsina y proteinasa K (Ibarra-Silva, 1999). Para ello, el diámetro de inhibición se midió antes y después de haber tratado al extracto celular con dichas proteasas.

En la tabla 6.1 se observa que el extracto libre de células obtenido a partir de *L. lactis* fue sensible a las enzimas probadas, debido a que presentó una disminución del 40 % de actividad para la proteinasa K y 60% para la quimotripsina en la longitud del diámetro de los halos de inhibición comparado con el control (Tabla 6.1). Esto sugiere que el compuesto con actividad antibacteriana producido por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 es de origen proteico y corresponde a una bacteriocina.

**Tabla 6.1** Sensibilidad de la bacteriocina producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 frente a enzimas

Enzima	Sensibilidad	Longitud de los diámetros de inhibición
Control		100 %
Quimotripsina	+	38.5
Proteinasa K	+	63.67

## 6.2 Selección de la concentración y fuente de carbono

La carne contiene 1.5% de carbohidratos (Baduí, 1999) lo cual resulta insuficiente para soportar el crecimiento de las BAL y producción de sus metabolitos. No obstante, si se adicionan pequeñas cantidades de azúcares fermentables, los cultivos iniciadores así como algunas bacterias lácticas nativas, pueden desarrollar una fermentación moderada sin afectar las cualidades sensoriales de la carne (Aymerich y Hugas, 1998).

La selección del tipo y concentración de la fuente de carbono que se adicionaría a los distintos inóculos se realizó con base en la reducción del pH y el aumento de la acidez total titulable (ATT) a través del tiempo. Se encontró que la reducción del pH y el aumento en la ATT en el músculo de pollo dependían del tipo de inóculo, pero no de la fuente de carbono. Mediante el análisis de comparación de medias por el método de Duncan se determinó que los valores promedio de pH más bajos y más altos en ATT se presentaron en aquellas muestras inoculadas con cultivos bioprotectores (Tabla 6.2). Las muestras inoculadas con *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 presentaron valores promedio de pH más bajos que aquellas inoculadas con *S. carnosus* MC-1-02055.

**Tabla 6.2.** Comparación de medias para pH y ATT por método de Duncan para la selección del inóculo y fuente de carbono

Variables	Niveles	pH	ATT
Inóculo	Testigo <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454	5.53 <sup>a</sup>	1.87 <sup>c</sup>
	<i>S. carnosus</i> MC-1-02055	5.367 <sup>b</sup>	2.04 <sup>a</sup>
		5.362 <sup>b</sup>	1.93 <sup>b</sup>
Fuente de carbono	Testigo (sin fuente de carbono)	5.97 <sup>a</sup>	1.77 <sup>b</sup>
	Glucosa	5.42 <sup>b</sup>	1.93 <sup>a</sup>
	Sacarosa	5.41 <sup>b</sup>	1.97 <sup>a</sup>
Concentración de sacarosa	Testigo (sin sacarosa)	5.86 <sup>a</sup>	1.73 <sup>c</sup>
	2.5%	5.67 <sup>b</sup>	1.83 <sup>d</sup>
	5.0%	5.30 <sup>c</sup>	1.99 <sup>c</sup>
	7.5%	5.19 <sup>d</sup>	2.04 <sup>b</sup>
	10%	5.10 <sup>e</sup>	2.14 <sup>a</sup>

\*Medias con superíndices con la misma letra presentan diferencia significativa

De acuerdo con lo anterior, se concluyó que es posible emplear como fuente de carbono ya sea glucosa o sacarosa. Se eligió sacarosa por ser una fuente de carbono más económica que la glucosa. Posteriormente, se observó que el incrementar la concentración de dicho carbohidrato se producía una reducción significativa ( $P > 0.0001$ ) en el pH y por consiguiente un aumento en la ATT de la carne ( $P > 0.0001$ ) (Tabla 6.2). Estos resultados sugieren que los inóculos adicionados al músculo de pollo producen ácidos orgánicos a partir de la utilización de sacarosa. Finalmente, se decidió preparar los inóculos con 2.5 y 5% de sacarosa porque con estas concentraciones se obtenían valores de pH cercanos al testigo, y porque el empleo de mayores concentraciones podría ocasionar cambios desfavorables en las características sensoriales de la carne de pollo; como son pérdida en la capacidad de retención de agua, cambios en el color, textura e integridad de las proteínas miofibrilares (McMullen y Stiles, 1996).

### 6.3. Efecto de la bioconservación de la carne sobre la población de microorganismos patógenos y causantes de deterioro

La bioconservación podría ser una alternativa viable y segura para mejorar la calidad microbiológica y por lo tanto aumentar la vida de anaquel de la carne (Mc Mullen y Stiles, 1996; Hugas, 1998 y Lücke, 2000). Como parte del estudio del efecto del empleo de cultivos bioprotectores y nisina sobre la calidad del músculo de pollo se analizó el efecto de la presencia de cultivos bioprotectores sobre las poblaciones adicionadas de algunos microorganismos indicadores de deterioro y de patógenos.

La numeración de estos microorganismos se realizó durante el almacenamiento. Además, la efectividad de los cultivos bioprotectores dependerá, en parte, de la capacidad de estos microorganismos para metabolizar los carbohidratos fermentables y de esta manera reducir el pH. Es por todo lo anterior que los inóculos arriba citados fueron preparados en presencia de 2.5 y 5% de sacarosa. Además, los experimentos correspondientes a la nisina únicamente se realizaron en presencia de 2.5% de sacarosa.

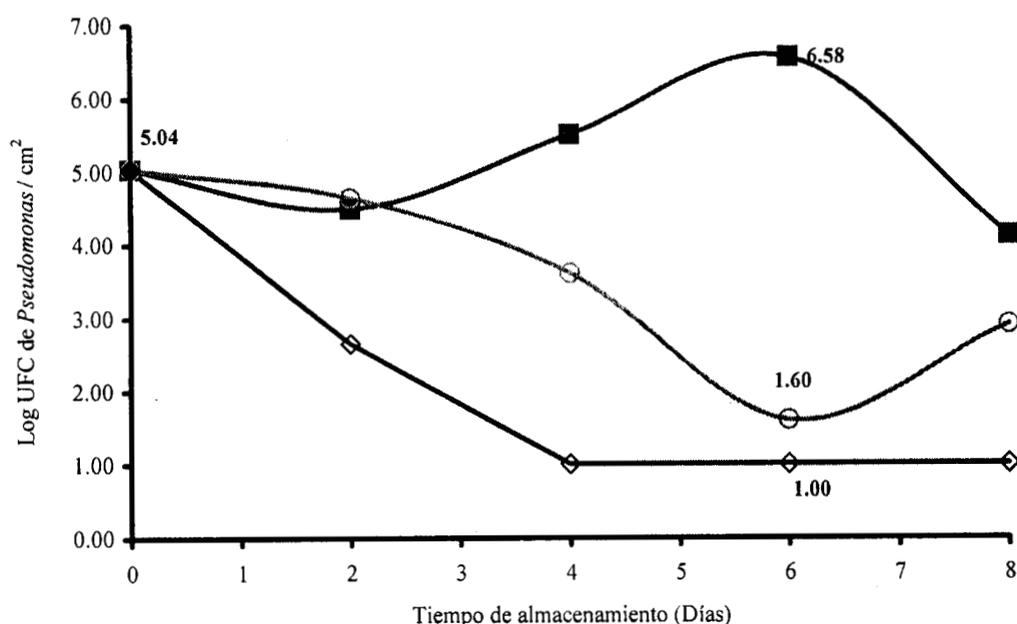
#### 6.3.1. Inoculación de la carne de pollo con cultivos bioprotectores, sacarosa 5%

##### 6.3.1.1 Población de *Pseudomonas*

El empleo de cultivos bioprotectores, específicamente *Lactobacillus alimentarius*, ha sido eficiente para reducir la cantidad de pseudomonas presentes sobre las canales de pollo refrigeradas (Guidolin y col., 1998). Este trabajo se enfocó al estudio del efecto del empleo de cultivos bioprotectores sobre la población de pseudomonas en el músculo de pollo almacenado en condiciones de abuso de temperatura ( $10\pm 2^{\circ}$  C) durante 8 días, debido a que se ha

reportado que existen grandes pérdidas económicas debido a los malos manejos en la temperatura de almacenamiento de la carne de ave.

En la figura 6.1 se muestra la variación de la población de pseudomonas en la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión celular que contenía *Pseudomonas fluorescens* C65, cultivos bioprotectores (*S. carnosus* MC-1-02055 o *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454) y 5% de sacarosa. El testigo (muestras inoculadas únicamente con *P. fluorescens* C65) presentó, en principio, una pequeña disminución en la población de *Pseudomonas* spp en el día 2. Sin embargo, se observó un incremento alrededor de 0.5 y 1.5 ciclos logarítmicos en los días 4 y 6 de almacenamiento. Y no fue sino hasta el día 8 en que se presentó una disminución de aproximadamente 2 ciclos logarítmicos. Además, se observa que el empleo de cultivos bioprotectores redujo significativamente ( $P > 0.0001$ ) (Tabla 6.3) el crecimiento de *Pseudomonas* desde el inicio del almacenamiento, especialmente en aquellas muestras inoculadas con la mezcla de *P. fluorescens* C65 + *S. carnosus* MC-1-02055, en donde la reducción en población de *Pseudomonas* spp en el día 6 fue de 4 ciclos logarítmicos mientras que para la mezcla de *P. fluorescens* + *L. lactis* fue de 3.5 ciclos.



**Figura 6.1.** Evolución de los recuentos medios de la población de *Pseudomonas* de la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de cultivos bioprotectores y *P. fluorescens* C65, adicionada con 5% de sacarosa y almacenada a  $10 \pm 2^\circ\text{C}$ . Símbolos: ■=Control (*P. fluorescens* C65), ◇= *P. fluorescens* C65+ *S. carnosus* MC-1-02055 y ○= *P. fluorescens* C65 + *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454

**Tabla 6.3.** Recuentos medios de la población de pseudomonas en la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de cultivos bioprotectores y *Pseudomonas fluorescens* C65, adicionada con 5% de sacarosa y almacenada a  $10 \pm 2^\circ\text{C}$

Tiempo (días)	<i>P. fluorescens</i> C65		
	Control ( <i>P. fluorescens</i> C65)	+ <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454	<i>P. fluorescens</i> C65 + <i>S. carnosus</i> MC-1-02055
0	5.04	5.04	5.04
2	4.49 ± 0.07	4.65 ± 0.49	2.65 ± 0.49
4	5.52 ± 0.09	1.6 ± 0.42	1 (ND)
6	6.58 (ND)	3.61 (ND)	1 ± 0.03
8	4.14 ± 0.51	2.91 ± 0.31	1 ± 0.07
<b>Promedio Final</b>	<b>5.16<sup>c</sup></b>	<b>3.56<sup>b</sup></b>	<b>2.1<sup>a</sup></b>

\* Medias con la misma letra no presentan diferencia significativa. Cada número es la media de dos muestras diferentes. Cada muestra fue analizada por duplicado. ND= desviación estándar no determinada

En la carne de pollo envasada al vacío almacenada en refrigeración, las bacterias lácticas y *Brochotrix thermosphacta* emergen como microflora dominante (Kakouri y Nychas, 1994; Molin, 2000). Por lo tanto, resulta extraño encontrar que la población de pseudomonas aumentara en el testigo durante los primeros 6 días de almacenamiento, sobre todo si tomamos en cuenta que se trata de microorganismos aerobios (Gill, 1986). En este sentido, Kakouri y Nychas (1994) observaron que la población de pseudomonas se incrementó hasta 100 veces después de 8 días de almacenamiento en el muslo de pollo empacado al vacío y almacenado a 3 y a 10°C. Por su parte Nielsen y col. (1990) también observaron resultados similares pero en carne de vacuno, ambos autores atribuyeron este comportamiento a la falta de una atmósfera 100% anaeróbica.

En este experimento, el incremento en la población de pseudomonas en el testigo se podría explicar de la siguiente manera: en principio, la carne de pollo se inoculó con una población considerable de *Pseudomonas fluorescens* C65 ( $10^9$  ufc/mL), la cual podría haber superado en número a la población de BAL nativas. Posteriormente, las pseudomonas lograron desarrollarse exitosamente debido a que poseen una gran afinidad por el oxígeno y pueden crecer incluso a bajas presiones de este elemento (Molin, 2000). A partir del día 6, la población de pseudomonas podría haberse inhibido por la acumulación de CO<sub>2</sub> producido por la flora nativa y por el metabolismo muscular, así como por la reducción del pH y la competencia por el sustrato por parte de las bacterias nativas (Molin, 2000; Nielsen y col., 1990).

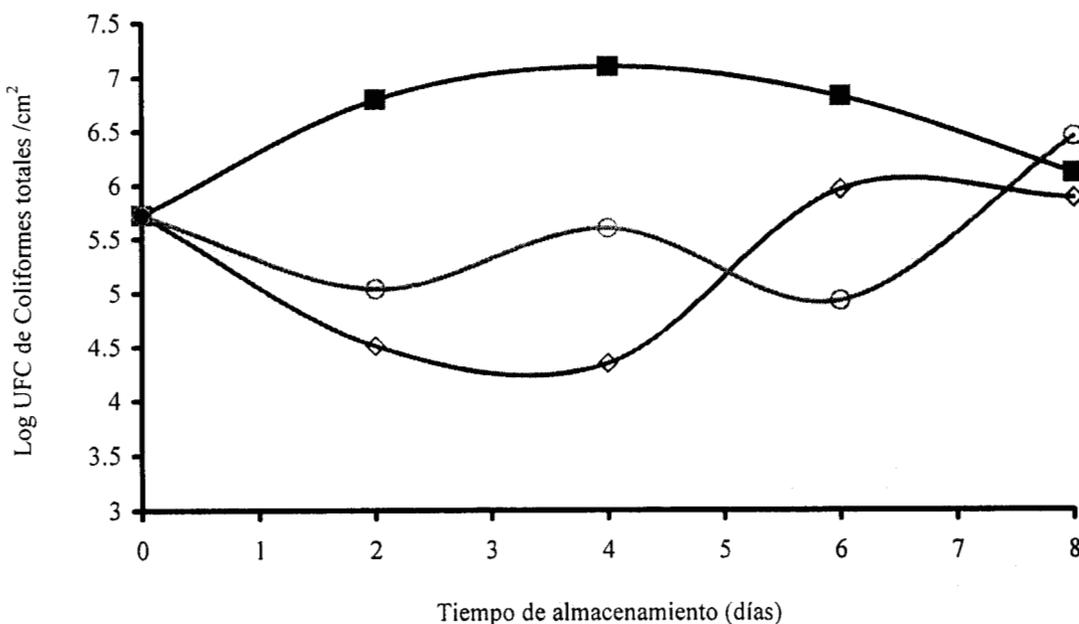
En las muestras inoculadas con *P. fluorescens* y *S. carnosus* o *L. lactis*, se observó la inhibición de pseudomonas a partir del día 2. En este caso, es muy probable que los cultivos bioprotectores adicionados a la carne crecieran favorablemente en condiciones anaeróbicas y produjeran un efecto antagónico contra las pseudomonas debido principalmente a la acidificación del medio, pero también a la competencia por nutrientes y espacio, producción de ácido láctico y otros metabolitos, así como a la producción de CO<sub>2</sub> ocasionada por el metabolismo muscular desde el inicio del almacenamiento, o al efecto sinérgico de estos

factores (McMullen y Stiles, 1996). Además, la bacteriocina producida por *L. lactis* resulta inefectiva contra bacterias del género *Pseudomonas* por ser Gram-negativas (Gill, 1986).

### 6.3.1.2. Poblaciones de coliformes totales

En la figura 6.2 se observa en el control un incremento en la población de coliformes totales alcanzando valores desde log 5.7 ufc/cm<sup>2</sup> al inicio del almacenamiento hasta log 6.11 ufc/cm<sup>2</sup> para el cuarto día. Sin embargo, a partir de aquí y hasta el día 8 hay una disminución de 2 ciclos logarítmicos. Con respecto las muestras inoculadas con *E. coli* y *S. carnosus* o *L. lactis*, se observó que los niveles promedio de coliformes totales permanecieron significativamente más bajos ( $P > 0.0001$ ) (Tabla 6.4) que con respecto al testigo. Las muestras inoculadas con *S. carnosus* (5.28) presentaron niveles promedio más bajos en la población de coliformes totales que las muestras con *L. lactis* (log 5.53 ufc).

Los microorganismos causantes de intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias como *Salmonella* y *E. coli* enterohemorrágico (0157:H7) comúnmente asociados al consumo de carne de aves (Conner y col., 2001), no pueden crecer y/o producir sus toxinas a temperatura de refrigeración, pero son un peligro potencial en condiciones de abuso de la temperatura de almacenamiento (Aymerich y Hugas, 1998). En este sentido, la numeración de coliformes puede ser útil como un indicador del abuso de la temperatura durante el almacenamiento (Zeitoun y col., 1994; Nielsen y col., 1990).



**Figura 6.2.** Evolución de los recuentos medios de la población de coliformes totales en carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de cultivos bioprotectores y *E. coli*, ATCC 8937 adicionada con 5% de sacarosa y almacenada a 10±2°C. Símbolos: ■=Control (*E. coli* ATCC 8937), ◇= *E. coli* ATCC 8937+ *S. carnosus* MC-1-02055 y ○= *E. coli* ATCC 8937 + *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454

**Tabla 6.4.** Recuentos medios de la población de coliformes totales en la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de cultivos bioprotectores y *E. coli* ATCC 8937, adicionada con 5% de sacarosa y almacenada a 10±2°C

Tiempo (días)	Control ( <i>E. coli</i> ATCC 8937)	<i>E. coli</i> ATCC 8937 + <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454	<i>E. coli</i> ATCC 8937 + <i>S. carnosus</i> MC-1-02055
0	5.72	5.72	5.72
2	6.8 ± 0.08	5.03 ± 0.02	4.51 ± 0.07
4	5.12 ± 0.24	5.6 (ND)	4.34 (ND)
6	6.82 ± 0.02	4.93 ± 0.21	5.96 (ND)
8	6.11 ± 0.05	6.45 ± 0.10	5.88 ± 0.25
<b>Promedio</b>	<b>6.11<sup>c</sup></b>	<b>5.54<sup>b</sup></b>	<b>5.28<sup>a</sup></b>

\* Medias con la misma letra no presentan diferencia significativa. Cada número es la media de dos muestras diferentes. Cada muestra fue analizada por duplicado. ND= desviación estándar no determinada

El empleo de BAL aisladas a partir de carne como cultivos bioprotectores ha sido sugerido como una alternativa para inhibir el crecimiento *E. coli* 0157:H7 en productos cárnicos cocinados (Bredholt y col., 1999). *Lactobacillus alimentarius* ha sido sugerido para inhibir la población de coliformes totales presentes sobre las carnes de pollo refrigerada (Guidolin y col., 1998).

El incremento en el número de coliformes en el testigo durante los primeros días de almacenamiento podría deberse a: (1) la naturaleza anaerobia facultativa de este tipo de microorganismos (Holt y col., 1994), (2) la capacidad de emplear los carbohidratos de carne y los adicionados y (3) a la capacidad que tienen estos microorganismos para crecer al pH inicial de la carne (5.8). Posteriormente, la disminución en la población de coliformes totales podría estar asociada al agotamiento de la fuente de carbono, así como a la disminución del pH y la producción de ácidos orgánicos debido al surgimiento de las BAL nativas como flora dominante (Kakouri y Nichas, 1994; Zamora y Zaritzky, 1985).

La inoculación de la carne de pollo con cultivos bioprotectores causó un efecto inhibitorio en la población de coliformes totales (Figura 6.2). Para las muestras inoculadas con *S. carnosus*, el efecto inhibitorio podría deberse a la capacidad de esta bacteria para producir suficiente ácido láctico y reducir el pH (Holt y col., 1994; Ricke y Keeton, 1997). En las muestras inoculadas con *L. lactis*, la inhibición de la población de coliformes totales podría deberse a la acción conjunta de la competencia por nutrientes, disminución del pH, producción de ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno. El efecto inhibitorio no podría deberse a la producción de bacteriocinas debido a que estas sustancias no son activas contra microorganismos Gram-negativos, a menos que se dañe la membrana celular (Vandenbergh, 1993; Hugas, 1998).

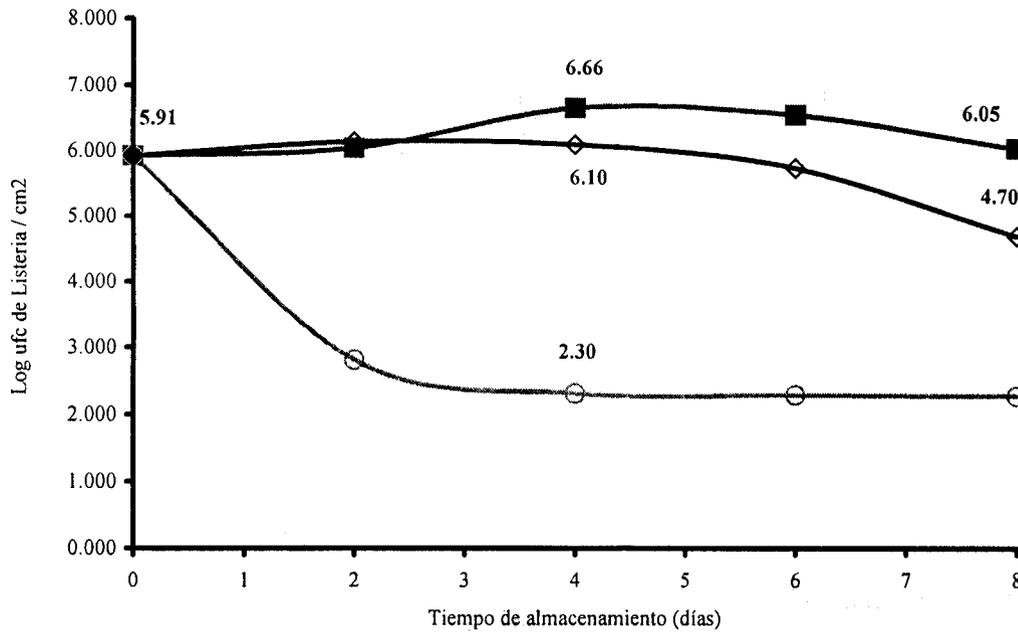
Finalmente, el hecho de que las muestras tratadas con cultivos bioprotectores presentaran niveles significativamente menores ( $P > 0.0001$ ) (Tabla 6.4) de coliformes, demuestra que *S. carnosus* y *L. lactis* pueden ser empleados para inhibir el desarrollo de estos microorganismos.

### 6.3.1.3. Poblaciones de *Listeria*

La carne de aves y en especial el pollo en cuales quiera de sus presentaciones: “listo para el consumo”, fresco, precocido, refrigerado o congelado, se encuentra comúnmente contaminado con *Listeria monocytogenes*. La contaminación con este microorganismo ocurre durante el proceso de matanza y puede representar un riesgo potencial para la población inmunocomprometida (Hugas, 1993). Además a diferencia de otros microorganismos patógenos, *Listeria* puede resistir condiciones ambientales adversas tales como bajo pH, altas concentraciones de NaCl y empacado al vacío (Rocourt y Cossart, 1997; Lücke, 2000).

En este experimento no se empleó *L. monocytogenes*, debido a que el laboratorio en donde se realizó toda la investigación no cuenta con las condiciones necesarias para trabajar con microorganismos patógenos. Sin embargo, el empleo de *L. innocua* como microorganismo indicador puede darnos una idea de la acción de los cultivos bioprotectores contra los microorganismos del género *Listeria* (Bell y Kyriakides, 1998; Hugas, 1993).

En la grafica 6.3 se observa que la adición de  $10^8$  ufc/cm<sup>2</sup> de *L. lactis* y *S. carnosus* como cultivos bioprotectores provocó un efecto inhibitorio significativo ( $P > 0.0001$ ) (Tabla 6.5) sobre la población de *Listeria* en el músculo de pollo almacenado al vacío y en condiciones de abuso de temperatura. Después de 4 días de almacenamiento las muestras inoculadas con *L. lactis* presentaron una disminución de aproximadamente 3.5 ciclos logarítmicos, y a partir de ahí el crecimiento de *Listeria* se mantuvo constante. Por otra parte, la población de *Listeria* en las muestras inoculadas con *S. carnosus* se mantuvo más o menos constante desde el inicio y hasta el día 6 sin embargo, en el día 8 hubo una reducción de aproximadamente 1 ciclo logarítmico (Figura 6.3). Por otra parte, los valores promedio más bajos en la población de *Listeria* se obtuvieron en las muestras inoculadas con *L. lactis*.



**Figura 6.3.** Evolución de los recuentos medios de la población de *Listeria* en carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de cultivos bioprotectores y *L. innocua* ATCC 33090 adicionada con 5% de sacarosa y almacenada a 10±2°C. Símbolos: ■=Control (*L. innocua* ATCC 33090), ◇= *L. innocua* ATCC 33090+ *S. carnosus* MC-1-02055 y ○= *L. innocua* ATCC 33090+ *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454

**Tabla 6.5.** Recuentos medios de la población de *Listeria* en la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de cultivos bioprotectores y *L. innocua* ATCC 33090, adicionada con 5% de sacarosa y almacenada a 10 ±2°C

Tiempo (días)	<i>L. innocua</i> ATCC 33090	<i>L. innocua</i> ATCC 33090 + <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454	<i>L. innocua</i> ATCC 33090 + <i>S. carnosus</i> MC-1-02055
0	5.91	5.91	5.91
2	6.04 ± 0.39	2.81 ± 0.47	6.14 ± 0.34
4	6.66 ± 0.14	2.30 ± 0.43	6.10 ± 0.25
6	6.56 ± 0.80	2.28 ± 0.53	5.75 ± 0.04
8	6.05 ± 0.04	2.26 ± 0.01	4.70 ± 0.21
Promedio	6.24 <sup>c</sup>	3.11 <sup>a</sup>	5.72 <sup>b</sup>

\* Medias con la misma letra no presentan diferencia significativa. Cada número es la media de dos muestras diferentes. Cada muestra fue analizada por duplicado. ND= desviación estándar no determinada

En la gráfica 6.3 se observa un ligero incremento en la población de *Listeria*, lo cual es lógico ya que se trata de un microorganismo anaerobio facultativo (Rocourt y Cossart, 1997). La reducción mostrada en muestras inoculadas con *S. carnosus* podría deberse básicamente a la reducción del pH y a la producción de ácido láctico por esta bacteria (Holt y col., 1994). El hecho de que en las muestras inoculadas con la mezcla que contenía *L. lactis* se haya producido una reducción de casi 3.5 ciclos logarítmicos en la población de *Listeria*, podría deberse a la competencia por nutrientes, disminución del pH, producción de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, pero sobre todo a la producción de bacteriocinas (Bredholt y col., 1999). No es la primera vez que se emplean BAL bacteriogénicas para inhibir *Listeria* en carne. Hugas y col., 1995 emplearon *Lactobacillus sake* CTC494, productora de sakacina, para inhibir el desarrollo de *Listeria monocytogenes* y *L. innocua* en salchichas. Goff y col. (1996), demostraron que una cepa de *Pediococcus acidilactici* productora de pediocina podría eliminar bajos niveles de *L. monocytogenes* en pollo crudo y cocido. Aymerich y Hugas (1998) emplearon una cepa de *Lactobacillus sake* productora de sakacina K para reducir e incluso después de 13 días de almacenamiento la población de *Listeria* en pechugas de pollo envasadas al vacío y previamente contaminadas con *Listeria*. Todos estos experimentos, además de los realizados en este trabajo, justifican la inhibición de *Listeria* debido a la producción *in situ* de bacteriocinas más que a la producción de ácido láctico. Sin embargo, no hay que perder de vista que el efecto inhibitorio de las bacteriocinas podría ser disminuido debido a la inactivación por las proteasas de la carne así como a la resistencia de *Listeria* (Lücke, 2000).

### 6.3.2. Biopreservación con inóculos de BAL o nisina adicionados con 2.5% sacarosa

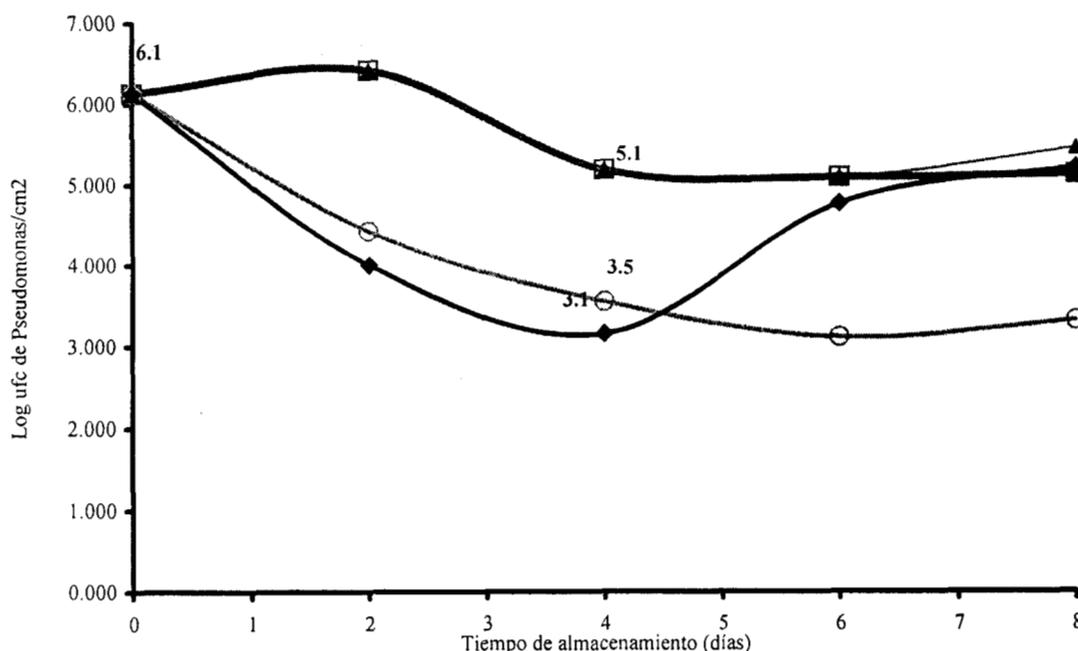
En la sección 6.3.3 se analizaron los resultados obtenidos de los experimentos correspondientes a la adición de 5% de sacarosa a los distintos inóculos de cultivos bioprotectores. Sin embargo, se sabe que la cantidad de carbohidratos fermentables podría afectar las características sensoriales y fisicoquímicas de la carne de pollo, debido a la

producción de grandes cantidades de ácidos orgánicos (Lücke, 2000). Por ello, también se decidió analizar los resultados microbiológicos obtenidos con la adición de 2.5% de sacarosa a los inóculos. Por otra parte, se analizará el efecto de la adición de nisina (12.5 mg/kg) sobre la población de microorganismos indicadores.

### 6.3.2.1. Población de *Pseudomonas*

En la figura 6.4 se observa que hay una disminución de la población de pseudomonas tanto en el testigo

como en las muestras inoculadas con nisina presentan un comportamiento muy similar y no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.524$ ) entre éstas. En el día 2 de almacenamiento ambas muestras presentan un ligero incremento (0.5 ciclos logarítmicos), posteriormente se observa una disminución (1.5 ciclos) en el día 4, pero a partir de ese punto y hasta el día 8 la población permaneció más o menos constante. Las muestras que se inocularon en presencia de *S. carnosus* mostraron una disminución de alrededor de 3 ciclos logarítmicos en el día 4. Sin embargo, a partir de este punto y hasta el día 8 mostraron un incremento en la población de pseudomonas. Este comportamiento podría deberse a que el conteo se realizó únicamente en 1 muestra y no en 2 como en los demás casos, por lo tanto no se pudo tomar en cuenta la desviación existente entre las muestras a la hora de realizar los promedios. Con respecto a las muestras inoculadas con *L. lactis*, presentaron una reducción gradual y muy semejante a la observada con *S. carnosus* desde el inicio del almacenamiento y hasta el día 4 (2 ciclos logarítmicos). En el día 8 la disminución fue de 3.2 ciclos logarítmicos, lo cual es menor que lo observado con 5% de sacarosa (5 ciclos). Esto podría deberse a una menor producción de dióxido de carbono en las muestras inoculadas con 2.5% de sacarosa debido a una menor concentración de azúcares fermentables. Finalmente podemos concluir que únicamente el empleo de cultivos bioprotectores puede causar reducciones significativas en la población de pseudomonas (Tabla 6.6).



**Figura 6.4** Evolución de los recuentos medios de la población de *Pseudomonas* de la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de cultivos bioprotectores o nisina y *P. fluorescens* C65, adicionada con 2.5% de sacarosa y almacenada a  $10 \pm 2^\circ\text{C}$ . Símbolos: ■=Control (*P. fluorescens* C65), ▲= *P. fluorescens* C65 +nisina, ◆ = *P. fluorescens* C65+ *S. carnosus* MC-1-02055 y ○= *P. fluorescens* C65 + *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454

**Tabla 6.6.** Recuentos medios de la población de *fluorescens* C65 en la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de cultivos bioprotectores o nisina y *L. innocua* ATCC 33090, adicionada con 5% de sacarosa y almacenada a  $10 \pm 2^\circ\text{C}$

Tiempo (días)	Control	<i>P. fluorescens</i> C65 +	<i>P. fluorescens</i> C65 +	
	<i>P. fluorescens</i> C65	Nisina	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>S. carnosus</i>
			ATCC 11454	MC-1-02055
0	6.134	6.196	6.134	6.134
2	6.42 ± 0.05	6.42 ± 0.05	4.42 ± 0.03	4 (ND)
4	5.19 ± 0.15	5.19 ± 0.15	3.54 ± 0.21	3.15 ± 0.21
6	5.091 ± 0.15	5.09 ± 0.15	3.10 ± 0.88	4.77 (ND)
8	5.131 ± 0.27	5.46 ± 0.11	3.30 ± 0.10	5.22 ± 0.62
<b>Promedio</b>	<b>5.59<sup>c</sup></b>	<b>5.67<sup>c</sup></b>	<b>4.1<sup>a</sup></b>	<b>4.66<sup>b</sup></b>

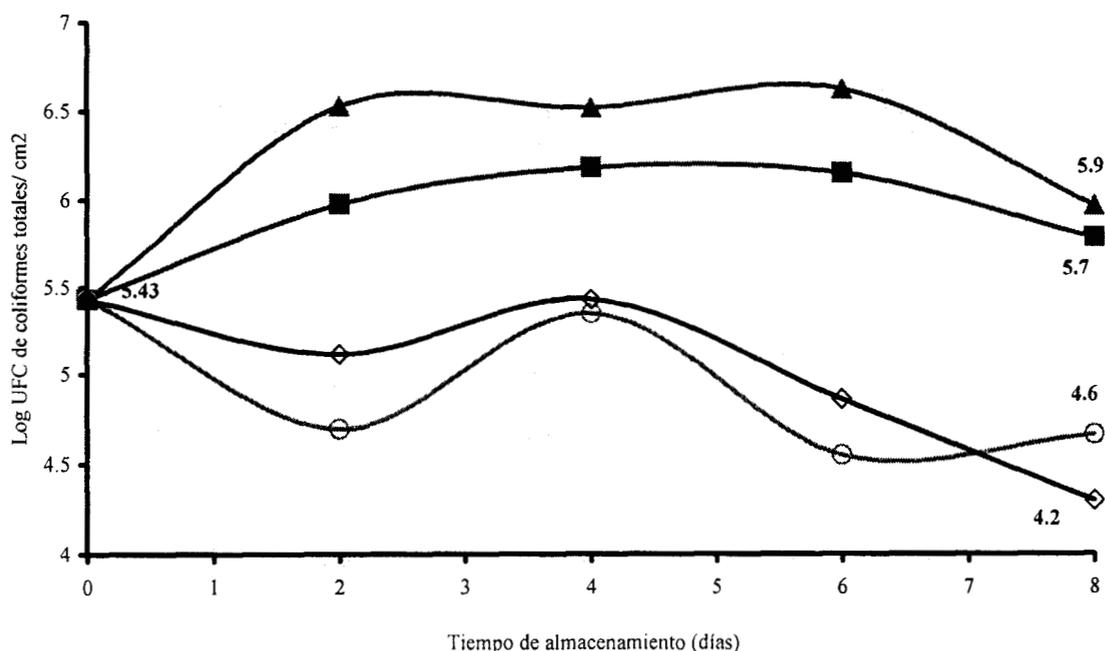
\* Medias con la misma letra no presentan diferencia significativa. Cada número es la media de dos muestras diferentes. Cada muestra fue analizada por duplicado. ND= desviación estándar no determinada.

### 6.3.2.2 Efecto sobre la población de *E. coli*

Al igual que en la figura 6.2, en la figura 6.5 el testigo muestra un incremento en la población de coliformes (0.7 ciclos logarítmicos) a partir del inicio del almacenamiento y hasta el día 4 a partir del cual se observa una disminución. Las muestras inoculadas en presencia de nisina presentaron comportamiento muy parecido al testigo solo que en este caso la población de coliformes totales se mantuvo aproximadamente 0.5 ciclos logarítmicos por arriba del testigo. Por su parte las muestras inoculadas con cultivos bioprotectores mantuvieron la población de coliformes por debajo de 1 ciclo logarítmico con respecto al testigo durante el almacenamiento.

Mediante un análisis estadístico se determinó que el empleo de cultivos bioprotectores o nisina redujo significativamente ( $P > 0.0001$ ) el crecimiento de la población de coliformes totales en la carne de pollo. Posteriormente, mediante un análisis de medias por el método de Duncan se determinó que no había diferencia significativa ( $P > 0.326$ ) en los recuentos promedio de las poblaciones de coliformes totales en las muestras inoculadas con *L. lactis* o *S.* (Tabla 6.7). Las muestras inoculadas en presencia de nisina presentaron una población promedio de coliformes totales mayor que la observada en el testigo.

Finalmente, la reducción en la población de coliformes totales fue menor que aquella observada en las muestras inoculadas en presencia de 5% de sacarosa, esto podría deberse a una menor producción de ácido láctico debido a una menor concentración de carbohidratos fermentables.



**Figura 6.5.** Evolución de los recuentos medios de la población de coliformes totales en carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de cultivos bioprotectores y *E. coli*, ATCC 8937 adicionada con 2.5% de sacarosa y almacenada a  $10 \pm 2^\circ\text{C}$ . Símbolos: ■=Control (*E. coli* ATCC 8937), ▲= *E. coli* ATCC 8937, ◇= *E. coli* ATCC 8937+ *S. carnosus* MC-1-02055, + nisina y ○= *E. coli* ATCC 8937 + *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454

**Tabla 6.7.** Recuentos medios de la población de coliformes totales en la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de cultivos bioprotectores o nisina y *E. coli* ATCC 8937, adicionada con 2.5% de sacarosa y almacenada a  $10 \pm 2^\circ\text{C}$

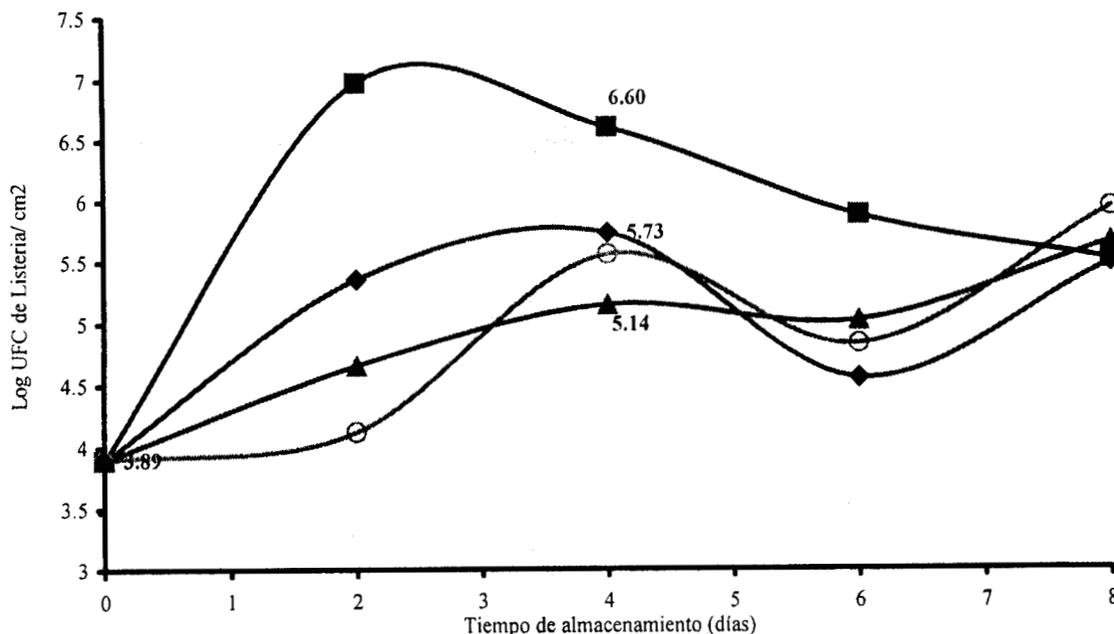
Tiempo (días)	Testigo ( <i>E. coli</i> ATCC 8937)	<i>E. coli</i> ATCC 8937 + nisina	<i>E. coli</i> ATCC 8937 + <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454	<i>E. coli</i> ATCC 8937 + <i>S. carnosus</i> MC-1-02055
0	5.43	5.43	5.43	5.43
2	5.97 ± 0.03	6.53 ± 0.03	4.69 ± 0.07	5.11 ± 0.29
4	6.18 ± 0.03	6.52 ± 0.06	5.34 ± 0.61	5.43 ± 0.24
6	6.15 ± 0.21	6.63 ± 0.21	4.55 ± 0.14	4.85 ± 0.12
8	5.78 ± 0.03	5.97 ± 0.29	4.66 ± 0.09	4.29 ± 0.09
Promedio	5.90 <sup>b</sup>	6.21 <sup>c</sup>	4.93 <sup>a</sup>	5.02 <sup>a</sup>

\* Medias con la misma letra no presentan diferencia significativa. Cada número es la media de dos muestras diferentes. Cada muestra fue analizada por duplicado. ND= desviación estándar no determinada.

### 6.3.2.3. Poblaciones de *Listeria*

En la figura 6.6 se muestra un incremento en el día 2 de almacenamiento en la población de *Listeria* (3 ciclos logarítmicos) en el testigo. Sin embargo, a partir de este punto y hasta el día 8 se observa un decremento importante (1.5 ciclos logarítmicos), lo cual podría deberse básicamente al agotamiento en la fuente de carbono aunado a la disminución del pH debido a la presencia de BAL nativas. En las muestras inoculadas en presencia de cultivos bioprotectores o nisina se produjeron niveles significativamente más bajos ( $P > 0.0001$ ) en la población de *Listeria* que en el testigo. Sin embargo, no se observó una reducción gradual en número de *Listeria* desde el inicio del almacenamiento, a diferencia de las muestras con 5% de sacarosa. En las muestras inoculadas en presencia de nisina, aunque la población de *Listeria* aumentó desde el inicio la población permaneció a niveles por debajo del testigo. Este hecho es de gran importancia ya que sugiere que la bacteriocina presentó actividad inhibitoria aún sobre la superficie del músculo de pollo pese a que podría haber sido atacada por las proteasas endógenas de la carne.

De acuerdo con el análisis de medias para la población promedio de *Listeria* no se observó diferencia significativa ( $P > 0.382$ ) en la reducción de la población de *Listeria* entre las muestras inoculadas con cultivos bioprotectores o nisina. El hecho de que la reducción en la población de *Listeria* sea menos evidente en las muestras con 2.5 que con 5% de sacarosa, podría deberse a una menor proliferación de población de las BAL nativas y cultivos bioprotectores ya sea una menor producción de metabolitos, incluyendo ácido láctico y por supuesto bacteriocinas. Finalmente, el hecho de que en las muestras inoculadas en presencia de nisina o cultivos bioprotectores se hallan producido niveles significativamente menores la población de *Listeria* tanto con 5 como con 2.5% de sacarosa es de gran importancia sobre todo si tomamos en cuenta que la concentración de carbohidratos afecta en gran medida las características de calidad de la carne fresca inoculada con cultivos bioprotectores.



**Figura 6.6.** Evolución de los recuentos medios de la población de *Listeria* en carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de cultivos bioprotectores y *L. innocua* ATCC 33090 adicionada con 2.5% de sacarosa y almacenada a  $10 \pm 2^\circ\text{C}$ . Símbolos: ■=Control (*L. innocua* ATCC 33090), ▲= *L. innocua* ATCC 33090 + nisina, ◊= *L. innocua* ATCC 33090+ *S. carnosus* MC-1-02055 y ○= *L. innocua* ATCC 33090+ *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454

**Tabla 6.8.** Recuentos medios de la población de *Listeria* en la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de cultivos bioprotectores o nisina y *L. innocua* ATCC 33090, adicionada con 2.5% de sacarosa y almacenada a  $10 \pm 2^\circ\text{C}$

Tiempo (días)	Testigo ATCC 33090	<i>L. innocua</i> ATCC 33090 + Nisina	<i>L. innocua</i> ATCC 33090 + <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 1145	<i>L. innocua</i> ATCC 33090 + <i>S. carnosus</i> MC-1-02055
0	3.9	3.9	3.9	3.9
2	6.97 ± 0.41	4.65 ± 0.27	4.12 (ND)	5.35 ± 0.36
4	6.6 (ND)	5.14 ± 0.56	5.56 (ND)	5.73 ± 0.92
6	5.87 ± 0.70	5.01 ± 0.43	4.82 ± 0.05	4.54 (ND)
8	5.5 ± 0.04	5.65 ± 0.02	5.94 ± 0.33	5.48 (ND)
<b>Promedio</b>	<b>5.77<sup>b</sup></b>	<b>4.87<sup>a</sup></b>	<b>4.86<sup>a</sup></b>	<b>5.00<sup>a</sup></b>

\* Medias con la misma letra no presentan diferencia significativa. Cada número es la media de dos muestras diferentes. Cada muestra fue analizada por duplicado. ND= desviación estándar no determinada.

#### **6.4. Producción de aminas biogénicas en carne de pollo inoculada con cultivos bioprotectores o nisina.**

El deterioro de la carne es causado por la acumulación de productos metabólicos o por la acción de enzimas extracelulares producidas por los microorganismos capaces de crecer a temperaturas de refrigeración (Conner y col., 2001). Las aminas biogénicas, específicamente las aminas cadaverina y putrescina, han sido estudiadas como indicadores del deterioro de la carne (Maijala, 1993; Guerrero y Taylor, 1994; Haláz y col., 1994; Jay, 1996).

Existen evidencias de que aminas como la putrescina, cadaverina y tiramina pueden ser formadas durante el almacenamiento de la carne roja fresca (Hernández-Jover y col., 1997). En este caso, putrescina y cadaverina fueron las únicas aminas detectadas. Al inicio del almacenamiento, la carne fresca de pollo se encontraba libre de aminas pero durante el almacenamiento se produjeron cantidades considerables de putrescina y cadaverina (Tablas 6.9 y 6.10). Además, se observó una mayor producción de cadaverina en las muestras inoculadas con 5% de sacarosa que con 2.5%.

##### **6.4.1. Producción de cadaverina**

Al inicio del almacenamiento no se detectó la presencia de cadaverina. Sin embargo, dicha amina se produjo durante el almacenamiento en condiciones de abuso de temperatura del músculo de pollo. En el día 2 las muestras inoculadas en presencia de nisina y de 2.5% de sacarosa fueron las únicas muestras en las que se detectó cadaverina (19.18  $\mu\text{g/g}$ ). En el día 6 en todas las muestras inoculadas tanto en presencia de 2.5 como con 5% de sacarosa se produjo cadaverina, independientemente del tipo de inóculo. No obstante, se produjeron mayores concentraciones de ésta amina en aquellas muestras en las que el inóculo contenía 5% de sacarosa que con 2.5% (Tabla 6.9). Al analizar estadísticamente la producción de cadaverina después de 8 días de almacenamiento en las muestras inoculadas en presencia de 2.5% de sacarosa se determinó que había diferencia significativa ( $P > 0.0001$ ) entre la cantidad

de cadaverina y las muestras inoculadas con cultivos bioprotectores o nisina. La producción de cadaverina en los distintos inóculos fue la siguiente: *L. lactis* (0.07 µg/g carne) < Testigo (6.7 µg/g carne) < *S. carnosus* (11.52 µg/g carne) < nisina (18.89 µg/g carne). Con respecto a las muestras inoculadas en presencia de 5% de sacarosa, la formación de cadaverina se detectó a partir del día 6, independientemente del tipo de inóculo. Por otra parte, también se observa que los niveles de cadaverina fueron mayores que aquellos mostrados con 2.5% de sacarosa. Destaca el hecho de que en este caso, las muestras inoculadas con cultivos bioprotectores o nisina presentaron niveles de cadaverina significativamente mayores que el testigo: *L. lactis* (26.1 µg/g carne) < *S. carnosus* MC-1-1-02055 (42.9) < nisina (43.48) < testigo (78.74) (Tabla 6.9).

La actividad aminodescarboxilasa presenta un pH óptimo entre 4.0 y 5.5 (Silla, 1996). Por lo tanto el hecho de que la producción de cadaverina aumentara considerablemente al final del almacenamiento podría haber sido ocasionado, a la reducción del pH por debajo de 5.8 (pH del pollo) ocasionada por la proliferación de las BAL nativas (en el testigo y nisina) (Jackson y col., 1997) y los cultivos bioprotectores, así como al incremento en la actividad de los microorganismos causantes de deterioro (Silla, 1996). En este caso, podría tratarse de microorganismos del género *Bacillus*, además de enterobacterias y *Brochotrix thermocphacta* las cuales poseen la capacidad de producir cadaverina (Dainty y col., 1986; Silla, 1996) y de crecer en el músculo de pollo almacenado al vacío (Jackson y col., 1997).

En las muestras inoculadas en presencia de 2.5% de sacarosa se observó que después de 8 días de almacenamiento, los mayores niveles de cadaverina se produjeron en las muestras adicionadas con nisina. Esto podría haber sido causado por la inhibición de algunas BAL nativas debido a la presencia de nisina, cosa que no sucedió con el testigo. La inhibición de las BAL nativas podría haber ocasionando por una menor producción de sustancias antagonistas y por lo tanto una menor inhibición de microorganismos con actividad aminodescarboxilasa. Por otra parte, el que en las muestras inoculadas con *S. carnosus* se produjeran niveles significativamente mayores de cadaverina que el testigo, resulta extraño, ya que la producción de ácido láctico podría haber inhibido a otros microorganismos contaminantes de la carne

capaces de producir cadaverina. Finalmente, los bajos niveles de cadaverina presentados en las muestras inoculadas con *L. lactis* podrían deberse a la inhibición de algunas BAL nativas y contaminantes con potencial aminodescarboxilasa (Haláz y col., 1994; Silla, 1996).

**Tabla 6.9.** Producción de cadaverina ( $\mu\text{g/g}$ ) en la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de cultivos bioprotectores o nisina, adicionada con 2.5 o 5% de sacarosa y almacenada a  $10 \pm 2^\circ\text{C}$

Día	Sacarosa 2.5%				Sacarosa 5.0%			
	Testigo	Nisina	<i>S. carnosus</i> MC-1-02055	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454	Testigo	Nisina	<i>S. carnosus</i> MC-1-02055	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454
0	0	0	0	0	0	0	0	0
2		19.18	0	0	0	0	0	0
	0	$\pm 0.54$						
6	11.92	29.68	6.55	0.07	96.96	45.9	54.18	9.83
	$\pm 1.45$		$\pm 1.30$	$\pm 0.05$	$\pm 4.85$		$\pm 0.91$	$\pm 5.87$
8	14.90 <sup>b</sup>	26.72 <sup>c</sup>	39.52 <sup>d</sup>	0.22 <sup>a</sup>	218.02 <sup>A</sup>	128.04 <sup>C</sup>	117.41 <sup>B</sup>	94.57 <sup>A</sup>
	$\pm 4.41$	$\pm 3.23$	$\pm 5.00$	$\pm 0.09$	$\pm 0.71$	$\pm 5.29$	$\pm 3.25$	$\pm 3.39$
<b>Promedio</b>	<b>6.7<sup>b</sup></b>	<b>18.89<sup>d</sup></b>	<b>11.52<sup>c</sup></b>	<b>0.07<sup>a</sup></b>	<b>78.746<sup>D</sup></b>	<b>43.48<sup>C</sup></b>	<b>42.90<sup>B</sup></b>	<b>26.10<sup>A</sup></b>

\* Medias con la misma letra no presentan diferencia significativa. Cada número es la media de dos muestras diferentes. Cada muestra fue analizada por duplicado. ND= desviación estándar no determinada

La producción de mayores niveles de aminas en aquellas muestras inoculadas en presencia de 5% de sacarosa podría explicarse a que la presencia de carbohidratos fermentables aumentó el crecimiento y la actividad de las bacterias aminodescarboxilasa positivas (Haláz y col., 1994; Silla, 1996). Sin embargo, aún cuando las concentraciones de cadaverina producidas en las muestras inoculadas en presencia de 5% de sacarosa fueron mayores que con 2.5%, se observó que el empleo de cultivos bioprotectores o nisina produjo niveles de cadaverina significativamente menores que el testigo. La presencia de menores niveles de cadaverina en muestras inoculadas con nisina podría explicarse con base en la acción antagonista de esta bacteriocina contra algunas BAL nativas taxonómicamente relacionadas y capaces de producir

aminas. Finalmente, las muestras inoculadas con *S. carnosus* o *L. lactis* podrían haber producido niveles más bajos de cadaverina debido a una mayor reducción del pH (Silla, 1996), producción de ácido láctico y bacteriocinas en el caso de *L. lactis* (Tabla 6.9).

#### 6.4.2. Producción de putrescina

En la tabla 6.10 se observa que en las muestras inoculadas con 2.5% de sacarosa la producción de putrescina, al igual que la de cadaverina, aumentó significativamente ( $P > 0.0001$ ) durante el almacenamiento, independientemente del inóculo. Después de 8 días de almacenamiento, las muestras inoculadas en presencia de nisina nuevamente produjeron niveles de putrescina significativamente mayores ( $P > 0.0001$ ) que el testigo (9.79  $\mu\text{g/g}$  carne), seguido por las muestras con *S. carnosus* (26.49  $\mu\text{g/g}$  carne) o *L. lactis* (5.1626.49  $\mu\text{g/g}$  carne). Con 5% de sacarosa no se observó producción de putrescina en las muestras inoculadas con *S. carnosus*. Sin embargo, en las muestras se produjo más del doble de putrescina que con 2.5% (Tabla 6.10). Las muestras inoculadas con *L. lactis* y nisina produjeron niveles de putrescina significativamente menores que el testigo

En embutidos secos, la disminución del pH puede ocasionar una menor producción de aminas, entre ellas, la putrescina debido a la reducción de la población de estreptococos fecales, mesófilos aerobios y enterobacterias (Silla, 1996). En este caso, probablemente una mayor concentración de carbohidratos fermentables favoreció el crecimiento de *S. carnosus* y de las BAL nativas, aumentando la producción de ácido láctico. Esto podría haber impedido la posibilidad de crecimiento y producción de aminas por parte de algunos microorganismos contaminantes tales como las enterobacterias o *Brochotrix thermosphacta* (Haláz y col., 1994; Silla, 1996) los cuales son capaces de producir aminas. El hecho de que algunas BAL nativas no hubieran producido putrescina podría deberse a la utilización de los carbohidratos fermentables por ser una fuente de energía más fácil de metabolizar que los aminoácidos. Finalmente, las muestras con *L. lactis* produjeron niveles de aminas significativamente menores que el testigo tal vez debido al efecto sinérgico del ácido láctico, peróxido de

hidrógeno y bacteriocinas contra algunos microorganismos contaminantes y BAL nativas con actividad aminodescarboxilante.

**Tabla 6.10.** Producción de putrescina en la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de cultivos bioprotectores o nisina, adicionada con 2.5 o 5% de sacarosa y almacenada a  $10 \pm 2^\circ\text{C}$

Día	Sacarosa 2.5%				Sacarosa 5.0%			
	Testigo	Nisina	<i>S. carnosus</i>	<i>L. lactis</i> subsp.	Testigo	Nisina	<i>S. carnosus</i>	<i>L. lactis</i>
			MC-1-02055	<i>lactis</i> ATCC 11454			MC-1-02055	subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454
0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	5.19 $\pm 0.38$	0.79	0	0	0	0	0
6	8.99	18.83	1.62 $\pm 0.11$	1.26 $\pm 1.15$	35.61 $\pm 2.47$		0	0
8	9.79 <sup>a</sup> $\pm 3.19$	18.49 <sup>b</sup> $\pm 1.85$	26.48 <sup>c</sup> $\pm 2.14$	5.16 <sup>a</sup> $\pm 2.72$	77.79 <sup>c</sup> $\pm 0.06$	41.24 <sup>b</sup> $\pm 2.55$	0	24.07 <sup>A</sup> $\pm 1.02$
<b>Promedio</b>	<b>4.69<sup>a</sup></b>	<b>10.62<sup>d</sup></b>	<b>7.22<sup>c</sup></b>	<b>1.60<sup>a</sup></b>	<b>28.35<sup>c</sup></b>	<b>10.31<sup>b</sup></b>	<b>0</b>	<b>6.01<sup>A</sup></b>

\* Medias con la misma letra no presentan diferencia significativa. Cada número es la media de dos muestras diferentes. Cada muestra fue analizada por duplicado. ND= desviación estándar no determinada

La producción de cadaverina se incrementó más rápidamente que la de putrescina durante el almacenamiento (Tablas 6.9 y 6.10). Resultados similares han sido observados en carnes rojas empacadas al vacío (Jay, 1996). De ahí que existan autores que sugieren que la producción de aminas debería ser evaluada en las carnes empacadas al vacío (Jay, 1996; Hernández-Jover y col, 1997). La determinación de aminas en la carne también podrían ser útiles para evaluar la frescura, en este sentido, Hernández-Jover y col., (1997) sugieren que valores de aminas por debajo de  $5\mu\text{g/g}$  podrían indicar una carne de alta calidad higiénica. Por otra parte, aunque la putrescina y cadaverina han sido reconocidos como potenciadores de la toxicidad de la

histamina y tiramina, no se han dado sugerencias de los niveles de seguridad de dichas aminas en los alimentos (Hernández-Jover y col., 1997). Sin embargo, con base en estos experimentos podríamos concluir que el empleo de *L. lactis* y *S. carnosus* como cultivos bioprotectores, o nisina podrían tener un efecto benéfico en la reducción de la formación de putrescina y cadaverina. En este sentido, Joosten y col.(1996) han encontrado que la formación de histamina en quesos puede prevenirse mediante el empleo de BAL productoras de bacteriocinas.

#### **6.4.3. –Producción de aminas biogénicas en el músculo de pollo inoculado con una mezcla de cultivos bioprotectores o nisina y microorganismos causantes de deterioro.**

Muchos autores han sugerido que la medición de los niveles de aminas puede ser útil para indicar el grado de deterioro de la carne y productos cárnicos (Silla, 1996). En la sección anterior se estudió el efecto del empleo de cultivos bioprotectores o nisina sobre la producción de aminas en el músculo de pollo. En este caso, se estudió de que manera el empleo de cultivos bioprotectores o nisina afecta la producción de aminas durante el almacenamiento en las muestras inoculadas con cultivos bioprotectores o nisina y microorganismos causantes de deterioro, en presencia de 2.5% de sacarosa.

##### **6.4.3.1. Producción de aminas biogénicas en muestras inoculadas con *E. coli* ATCC 8937 y cultivos bioprotectores o nisina.**

De acuerdo con la literatura, las enterobacterias producen preferentemente cadaverina (Jay, 1996). Por otra parte, también se ha encontrado que existe una alta correlación entre la producción de cadaverina y la cuenta de coliformes (Halász, y col., 1994; Jay, 1996), de ahí que se sugiera su empleo como un índice de deterioro de la carne y productos cárnicos (Silla, 1996; Hernández-Jover y col., 1997).

En las tablas 6.11 y 6.12 se observa que la producción de cadaverina y putrescina se incrementa durante el almacenamiento. Los mayores niveles de putrescina y cadaverina se produjeron en el testigo, el cual se inoculó únicamente con *E. coli*. Las muestras inoculadas con cultivos bioprotectores o nisina produjeron niveles promedio de putrescina y cadaverina significativamente menores ( $P > 0.0001$ ) que el testigo. Pero además las muestras inoculadas con cultivos bioprotectores retardaron la aparición de dichas aminas. De hecho, las muestras inoculadas en presencia de *L. lactis* no produjeron putrescina después de 8 días de almacenamiento.

Al realizar un análisis estadístico en el día 8 se determinó que la producción de cadaverina en orden con los distintos inoculos fue la siguiente: *L. lactis* ( $8.6 \mu\text{g/g}$  de carne) < *S. carnosus* (16.98) < nisina (54.81) < testigo (58.45). El hecho de que las muestras inoculadas en presencia de nisina se produjeran niveles de cadaverina significativamente menores ( $P > 0.0001$ ) que el testigo podría haber sido ocasionado por su acción bactericida sobre algunas BAL nativas con actividad aminodescarboxilasa. Esto podría haber sido causado por una menor producción de ácido y por lo tanto una menor inhibición de coliformes. Por otra con respecto a la producción de putrescina se determinó que únicamente las muestras inoculadas con cultivos bioprotectores retardaron significativamente ( $P > 0.0001$ ) la producción de putrescina (Tabla 6.12).

El hecho de que en las muestras inoculadas con cultivos bioprotectores retardaran significativamente ( $P > 0.0001$ ) la producción de cadaverina podría deberse a la inhibición de los coliformes totales, debido básicamente a la reducción del pH. Esto no sucedió en las muestras inoculadas con nisina dado que las muestras no se inocularon con ningún cultivo bioprotector. De hecho, la presencia de nisina podría haber ocasionado la inhibición de algunas BAL nativas, al igual que en el caso anterior, y por lo tanto la producción de sus metabolitos. Finalmente, aunque la putrescina es preferentemente producida por pseudomonas (Jay, 1996), se encontró que el empleo de cultivos bioprotectores también retardó la producción de esta amina probablemente también por la reducción del pH.

**Tabla 6.11.** Producción de cadaverina en la carne de pollo inoculada por inmersión con una mezcla de cultivos bioprotectores o nisina y *E. coli* ATCC 8937 adicionada con 2.5 y almacenada a  $10 \pm 2^\circ\text{C}$

Día	Testigo ( <i>E. coli</i> ATCC 8937)	<i>E. coli</i> ATCC 8937 +	<i>E. coli</i> ATCC 8937 +	<i>E. coli</i> ATCC 8937 +
		Nisina	<i>S. carnosus</i> MC-1-02055	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454
0	0	0	0	0
2	0	0	0	0
4	61.35 $\pm$ 5.41	20.65 $\pm$ 10.81	0	1.63
6	60.51 $\pm$ 11.78	25.30 $\pm$ 12.66	0	-
8	58.45 <sup>b</sup> $\pm$ 3.69	54.80 <sup>b</sup> $\pm$ 10.57	16.98 <sup>a</sup> $\pm$ 4.14	8.60 <sup>a</sup>
Promedio	36.06 <sup>C</sup>	20.15 <sup>B</sup>	3.39 <sup>A</sup>	2.05 <sup>A</sup>

\* Medias con la misma letra no presentan diferencia significativa. Cada número es la media de dos muestras diferentes. Cada muestra fue analizada por duplicado. ND= desviación estándar no determinada

**Tabla 6.12.** Producción de putrescina en la carne de pollo inoculada por inmersión con una mezcla de cultivos bioprotectores o nisina y *E. coli* ATCC 8937 adicionada con 2.5 y almacenada a  $10 \pm 2^\circ\text{C}$

Día	Testigo ( <i>E. coli</i> ATCC 8937)	<i>E. coli</i> ATCC 8937 +	<i>E. coli</i> ATCC 8937 +	<i>E. coli</i> ATCC 8937 +
		Nisina	<i>S. carnosus</i> MC-1-02055	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454
0	0	0	0	0
2	0	0	0	0
4	42.08 $\pm$ 13.4	7.93 $\pm$ 5.6	0	0
6	36.22 $\pm$ 6.4	18.93 $\pm$ 3.1	0	0
8	31.26 <sup>b</sup> $\pm$ 1.0	27.85 <sup>b</sup> $\pm$ 8.0	9.69 <sup>a</sup> $\pm$ 2.4	-
Promedio	21.91 <sup>C</sup>	10.15 <sup>B</sup>	1.93 <sup>B</sup>	0

\* Medias con la misma letra no presentan diferencia significativa. Cada número es la media de dos muestras diferentes. Cada muestra fue analizada por duplicado. ND= desviación estándar no determinada

### 6.4.3.2. Crecimiento de la población de coliformes totales y su relación con la producción de aminas biogénicas

En la figura 6.7 se muestra una gráfica del efecto del almacenamiento sobre la población de coliformes totales y la producción de aminas en las muestras de pollo inoculadas únicamente con *E. coli*. En esta gráfica se observa que la producción tanto de putrescina como de cadaverina se encontró asociada al crecimiento de la población de coliformes, lo cual coincide con lo reportado en la literatura (Haláz y col., 1996; Jay, 1996). Sin embargo a partir del día 6 se observó una pequeña reducción en la concentración de aminas. Este fenómeno pudo haber ocurrido por la hidrólisis de las aminas presentes debido a la producción de algunas enzimas amino-oxidasas por *E. coli*. Por otra parte, se observa que en este caso las muestras inoculadas con *E. coli* produjeron preferentemente cadaverina, lo cual también coincide con la literatura (Haláz y col., 1994; Jay, 1996).

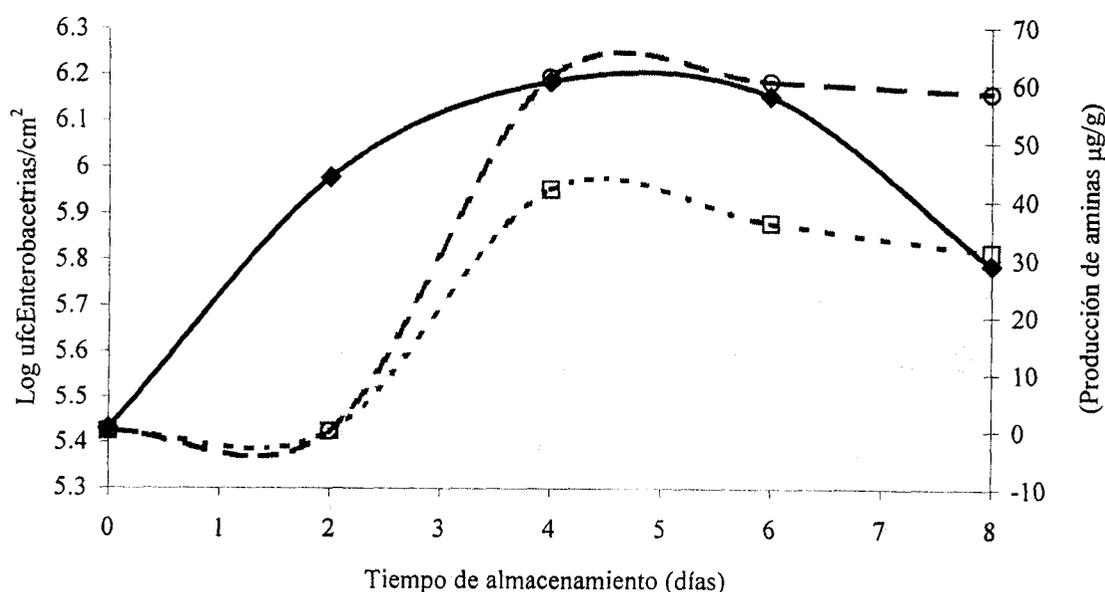


Figura 6.7 Variación de la población de coliformes totales y producción de aminas biogénicas en la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión con *E. coli* ATCC 8937, adicionada con 2.5% de sacarosa. Símbolos: ■ = crecimiento de coliformes totales, ○ = producción de cadaverina, □ = producción de putrescina.

#### 6.4.3.3. Producción de aminas biogénicas en muestras inoculadas con *P.fluorescens* C65 y cultivos bioprotectores o nisina.

En las tablas 6.13 y 6.14 se observa que la producción de cadaverina y putrescina se incrementa durante el almacenamiento, independientemente del tipo de inóculo. Al realizar un análisis estadístico en el día 8 para la producción de cadaverina se determinó que la adición de cultivos bioprotectores o nisina, produjo niveles de cadaverina significativamente ( $P>0.0001$ ) menores que el testigo. Mientras que en el testigo se produjeron 74.15  $\mu\text{g/g}$  de carne, en las muestras inoculadas en presencia de nisina, *L. lactis* y *S. carnosus* se produjeron 25.49, 28.16 y 29.30  $\mu\text{g/g}$  de carne, respectivamente.

Se observa que empleo de *L. lactis* o *S. carnosus* retardó la aparición de putrescina. Mientras que el testigo y las muestras inoculadas en presencia de nisina la putrescina se detectó a partir del día 4 de almacenamiento, en las muestras inoculadas con cultivos bioprotectores las aminas se detectaron hasta los días 8 y 6, respectivamente. Además, también se determinó que las muestras inoculadas en presencia de cultivos bioprotectores o nisina produjeron niveles de putrescina significativamente ( $P>0.0001$ ) menores que el testigo.

**Tabla 6.13.** Producción de cadaverina en la carne de pollo inoculada por inmersión con una mezcla de cultivos bioprotectores o nisina y *P. fluorescens* C65 adicionada con 2.5 y almacenada a  $10 \pm 2^\circ\text{C}$

Día	Testigo ( <i>P. fluorescens</i> C65)	<i>P. fluorescens</i> C65 +	<i>P. fluorescens</i> C65 +	<i>P. fluorescens</i> C65 +
		Nisina	<i>S. carnosus</i> MC-1-02055	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454
0	0	0	0	0
2	0	0	0	0
4	56.66 $\pm$ 9.88	41.11 $\pm$ 20.77	0	0
6	10.82 $\pm$ 0.71	16.58 $\pm$ 0.78	14.88 $\pm$ 0.80	0
8	75.14 <sup>B</sup> $\pm$ 4.47	25.49 <sup>A</sup> $\pm$ 13.32	29.30 <sup>A</sup>	28.16 <sup>A</sup> $\pm$ 3.11
Promedio	28.52 <sup>C</sup>	16.63 <sup>B</sup>	8.83 <sup>A</sup>	5.63 <sup>A</sup>

\* Medias con la misma letra no presentan diferencia significativa. Cada número es la media de dos muestras diferentes. Cada muestra fue analizada por duplicado. ND= desviación estándar no determinada

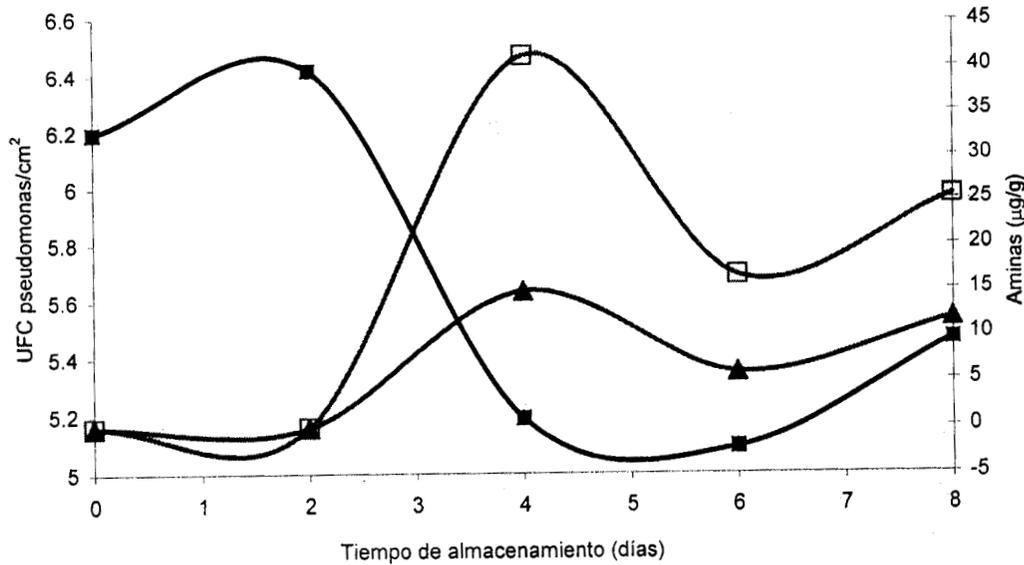
**Tabla 6.14.** Producción de putrescina en la carne de pollo inoculada por inmersión con una mezcla de cultivos bioprotectores o nisina y *P. fluorescens* C65 adicionada con 2.5 y almacenada a  $10 \pm 2^\circ\text{C}$

Día	Testigo ( <i>P. fluorescens</i> C65)	<i>P. fluorescens</i> C65 +	<i>P. fluorescens</i> C65 +	<i>P. fluorescens</i> C65 +
		Nisina	<i>S. carnosus</i> MC-1-02055	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454
0	-	-	-	-
2	-	-	-	-
4	20.51 $\pm$ 4.49	14.87 $\pm$ 8.68	-	-
6	13.89	5.87 $\pm$ 0.41	-	3.24
8	34.01 <sup>c</sup> $\pm$ 1.6	11.76 <sup>b</sup> $\pm$ 2.05	13.32 <sup>b</sup> $\pm$ 1.80	3.09 <sup>a</sup> $\pm$ 0.05
Promedio	13.68 <sup>C</sup>	6.50 <sup>B</sup>	2.66 <sup>A</sup>	1.26 <sup>A</sup>

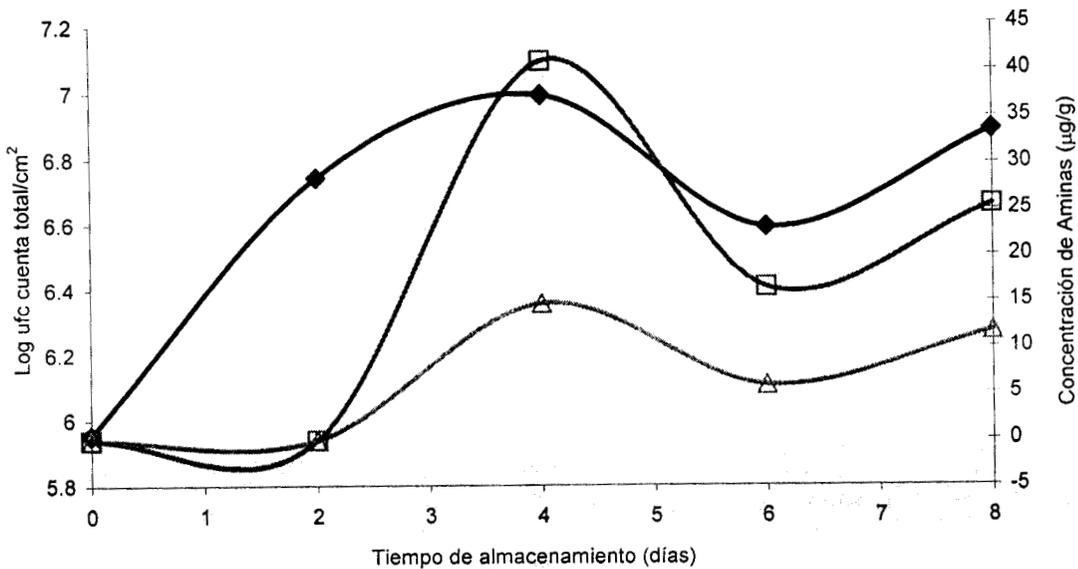
\* Medias con la misma letra no presentan diferencia significativa. Cada número es la media de dos muestras diferentes. Cada muestra fue analizada por duplicado. ND= desviación estándar no determinada

#### 6.4.6.4. Crecimiento de la población de pseudomonas y su relación con la producción de aminas biogénicas

En la figura 6.8 se demuestra que en las muestras inoculadas con pseudomonas en presencia de nisina, la producción de aminas biogénicas no se encuentra asociada al crecimiento de pseudomonas ya que se observa que mientras la población de pseudomonas desciende mientras la concentración de aminas aumenta. Estos resultados coinciden con la literatura (Haláz y col., 1994; Jay, 1996) en la cual se cita que las pseudomonas producen principalmente putrescina, y que además, la producción de esta amina se encuentra asociada al crecimiento (Jay, 1996). En los resultados aquí mostrados, además de que la producción de cadaverina y putrescina se incrementó durante el almacenamiento, la producción de cadaverina es mayor que la de putrescina. De acuerdo con lo anterior, parece ser que la producción de aminas, en este caso, no se encuentra asociado al crecimiento de pseudomonas. En la figura 6.9 se observa que la producción de cadaverina y putrescina se encuentra perfectamente asociada a la cuenta total de microorganismos. Estos resultados coinciden con estudios realizados por Dainty y col. (1986) en carne de vacuno almacenada al vacío. Estos autores observaron que no había producción de aminas en las muestras inoculadas con *Pseudomonas spp.* Sin embargo, encontró que el incremento en la producción de aminas estaba asociadas a la cuenta total viable.



**Figura 6.8** Crecimiento de *Pseudomonas* y producción de aminas durante el almacenamiento a 10°C de la carne de pollo inoculada por inmersión con *Pseudomonas fluorescens* C65 y nisina, almacenada a 10°C. Símbolos ■ = crecimiento de pseudomonas, □ = producción de cadaverina y ▲ = producción de putrescina



**Figura 6.9** Cuenta de mesófilos aerobios y producción de aminas biogénicas durante el almacenamiento a 10°C de la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión con *Pseudomonas fluorescens* C65 y nisina. Símbolos ◆ = crecimiento □ = producción de cadaverina y ▲ = Producción de putrescina

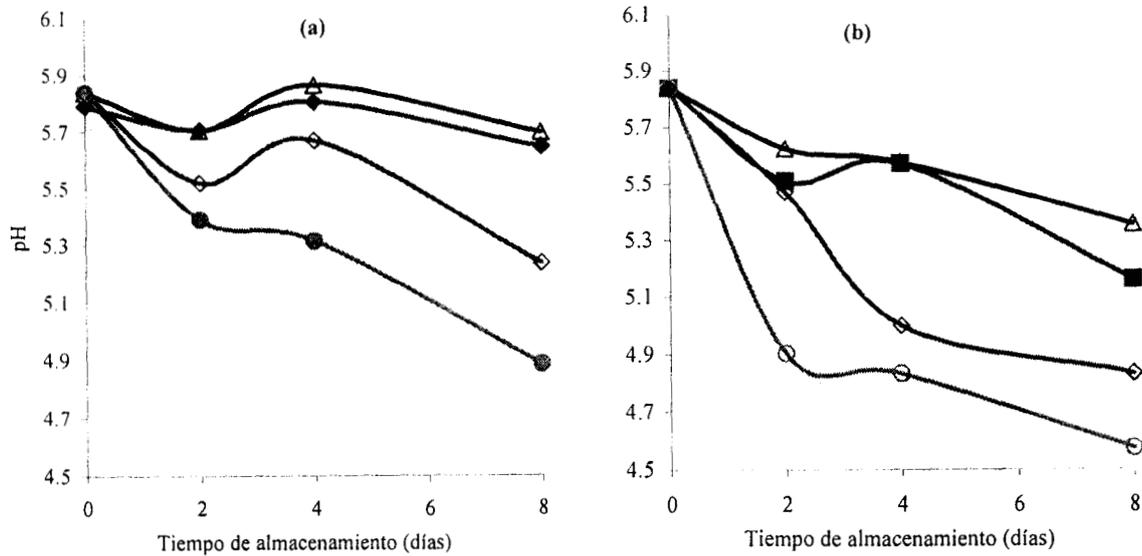
## 6.5. Efecto del empleo de cultivos bioprotectores y nisina sobre los parámetros de calidad de la carne

### 6.5.1. pH y acidez total titulable

El pH es un parámetro que afecta el color, la capacidad de retención de agua y la textura de la carne (Guerrero y Arteaga, 1990), y por lo tanto también determina en gran medida el grado de aceptación de la carne por parte del consumidor.

Al inicio del almacenamiento la carne de pollo presentaba un pH alrededor de 5.8 (Figura 6.10a). Este pH, junto con el empacado al vacío de la carne, podrían haber favorecido el crecimiento de BAL nativas (Jackson y col., 1997) y cultivos bioprotectores con la consiguiente producción de ácidos orgánicos, incluyendo el ácido láctico (Friedrich y Lücke, 2000). En la figura 6.10 se observa una rápida reducción del pH en las muestras que contenían 5% de sacarosa comparado con las que contenían 2.5%, es decir que la adición de una mayor concentración de azúcares fermentables favoreció una mayor reducción del pH.

Mediante el análisis estadístico correspondiente y una comparación de medias por el método de Duncan, se comprobó que la adición de BAL favoreció significativamente ( $P > 0.0001$ ) la reducción del pH en el músculo de pollo independientemente de la concentración de sacarosa adicionada a los inóculos (Tabla 6.15 y 6.16). Los valores promedio más bajos de pH se observaron en las muestras inoculadas en la suspensión celular que contenía *Lactococcus lactis* 4, (5.35 y 5.04 para 2.5% y 5% de sacarosa respectivamente), seguidas por las muestras inoculadas en presencia de *S.carnosus* (5.55 y 5.29), el testigo (5.67 y 5.6) y finalmente para las muestras inoculadas en presencia de nisina (5.76 y 5.70). El hecho de que el mayor valor promedio de pH se observe en las muestras inoculadas con nisina podría haber sido ocasionado por la inhibición de microorganismos acidificantes por esta bacteriocina (McMullen y Stiles, 1996).



**Figura 6.10.** Evolución en el pH durante el almacenamiento a 10°C de la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de BAL o nisina en presencia de (a) 2.5% y (b) 5% de sacarosa. ■= Testigo, Δ= Nisina, ◊= *S. carnosus* MC-1-020555 y ○= *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454.

Con respecto a la ATT, se sabe que existe una relación inversa entre este parámetro y el pH, es decir, mientras que el pH desciende la ATT se incrementa. Durante el almacenamiento del músculo de pollo en condiciones de abuso de temperatura se observó un incremento en la ATT. Después de analizar estadísticamente los datos se determinó que la ATT del músculo de pollo dependía significativamente ( $P > 0.0001$ ) del tipo de inóculo. Posteriormente mediante la comparación de medias por el método de Duncan se determinó que los mayores niveles promedio de ATT se produjeron en las muestras inoculadas ya sea con *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 o *S. carnosus* MC-1-02055, tanto en presencia de 2.5 como con 5% de sacarosa (Tabla 6.15 y 6.16). Con respecto a las muestras inoculadas en presencia de nisina no mostraron diferencia significativa en la ATT con respecto al testigo. Este hecho resulta muy interesante debido a que el empleo de nisina podría en un momento dado conservar la calidad microbiológica de la carne sin afectar los parámetros de calidad.

**Tabla 6.15.** Variación del pH y la ATT, en el músculo de pollo inoculado por inmersión con cultivos bioprotectores o nisina en presencia de 2.5% de sacarosa y almacenado a 10°C.

	Testigo		Nisina		<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454		<i>S. carnosus</i> MC-1-02055	
Tiempo (Día)	pH	ATT	pH	ATT	pH	ATT	pH	ATT
0	5.79	1.54	5.79	1.54	5.79	1.54	5.79	1.54
2	5.65	1.41	5.71	1.38	5.39	1.54	5.52	1.59
	± 0.01	± 0.08	± 0.06	± 0.02	± 0.03	± 0.02	± 0.01	ND
4	5.85	1.37	5.87	1.54	5.32	1.58	5.67	1.50
	± 0.06	± 0.04	± 0.02	± 0.05	± 0.15	± 0.01	± 0.08	± 0.16
	5.39	1.70	5.70	1.72	4.89	2.08	5.24	2.03
8	± 0.01	± 0.08	± 0.03	± 0.01	± 0.03	± 0.06	± 0.01	ND
Promedios	5.67 <sup>c</sup>	1.50 <sup>A</sup>	5.76 <sup>d</sup>	1.54 <sup>A</sup>	5.35 <sup>a</sup>	1.68 <sup>B</sup>	5.55 <sup>b</sup>	1.66 <sup>B</sup>

\* Medias con la misma letra no presentan diferencia significativa. Cada número es la media de dos muestras diferentes. Cada muestra fue analizada por duplicado. ND= desviación estándar no determinada

**Tabla 6.16.** Variación del pH y la ATT, en el músculo de pollo inoculado por inmersión con cultivos bioprotectores o nisina en presencia de 5% de sacarosa y almacenado a 10°C.

	Testigo		Nisina		<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454		<i>S. carnosus</i> MC-1-02055	
Tiempo (Día)	pH	ATT	pH	ATT	pH	ATT	pH	ATT
0	5.84	1.57	5.84	1.57	5.84	1.57	5.84	1.57
2	5.51	1.46	5.63	1.50	4.91	1.71	5.47	1.51
	± 0.03	± 0.14	± 0.01	0.11	± 0.02	ND	± 0.05	± 0.07
4	5.57	1.57	5.58	1.55	4.84	1.97	5.00	1.94
	± 0.01	± 0.03	± 0.01	± 0.25	± 0.02	± 0.05	(ND)	± 0.01
	5.16	2.13	5.36	2.18	4.58	2.77	4.84	2.37
8	± 0.04	± 0.36	± 0.03	± 0.12	± 0.02	± 0.15	± 0.01	± 0.08
Promedios	5.52 <sup>c</sup>	1.68 <sup>A</sup>	5.60 <sup>d</sup>	1.70 <sup>A</sup>	5.04 <sup>a</sup>	2.00 <sup>C</sup>	5.29 <sup>b</sup>	1.85 <sup>B</sup>

\* Medias con la misma letra no presentan diferencia significativa. Cada número es la media de dos muestras diferentes. Cada muestra fue analizada por duplicado. ND= desviación estándar no determinada

### 6.5.2. Efecto sobre capacidad de retención de agua (CRA)

La capacidad de retención de agua (CRA) es una característica muy importante de la carne ya que muchas propiedades tales como el color, la textura y la firmeza de la carne cruda, así como la jugosidad y la suavidad de la carne procesada dependen en gran parte de esta propiedad (Guerrero y Arteaga, 1990; Ponce y col., 2000).

En la tabla 6.17 se muestra la evolución en la CRA durante el almacenamiento del músculo de pollo tratado en presencia de 2.5 y 5% de sacarosa. En ambos casos, las muestras inoculadas con *L. lactis* presentaron una disminución significativa ( $P>0.0001$ ) de la CRA promedio (Tabla 6.17). En este sentido, la disminución en la CRA promedio fue más dramática en las muestras con 5% (CRA=5.75 mL NaCl 0.6 M retenidos/100 g carne) que con 2.5% de sacarosa (CRA=10 mL NaCl 0.6 M retenidos/100 g carne). En este caso, una mayor cantidad de sacarosa podría haber promovido una mayor acidificación. Esto trajo consigo una disminución del pH y por consiguiente una pérdida en la CRA debido a los cambios en la carga neta de las proteínas de la carne (Ponce y col., 2000).

Las muestras inoculadas con *L. lactis* o *S. carnosus* y adicionadas con 5% de sacarosa disminuyeron significativamente ( $P>0.0001$ ) la CRA promedio. Con 2.5 % de sacarosa se observó una menor pérdida en la CRA que con 5%, pero las muestras inoculadas con *L. lactis* nuevamente presentaron una disminución significativa en la CRA promedio. Por su parte las muestras inoculadas con *S. carnosus* no presentaron una disminución significativa en la CRA promedio. Las muestras adicionadas con nisina presentaron una CRA significativamente ( $P>0.0001$ ) mayor (25.5 mL de NaCl 0.6 M/100 g de carne) que el testigo (19.25 NaCl 0.6M /100 g de carne). Este aumento en la CRA promedio podría explicarse por aumento en la capacidad de hidratación de las proteínas de la carne debido al incremento del pH (Tabla 6.15-6.16).

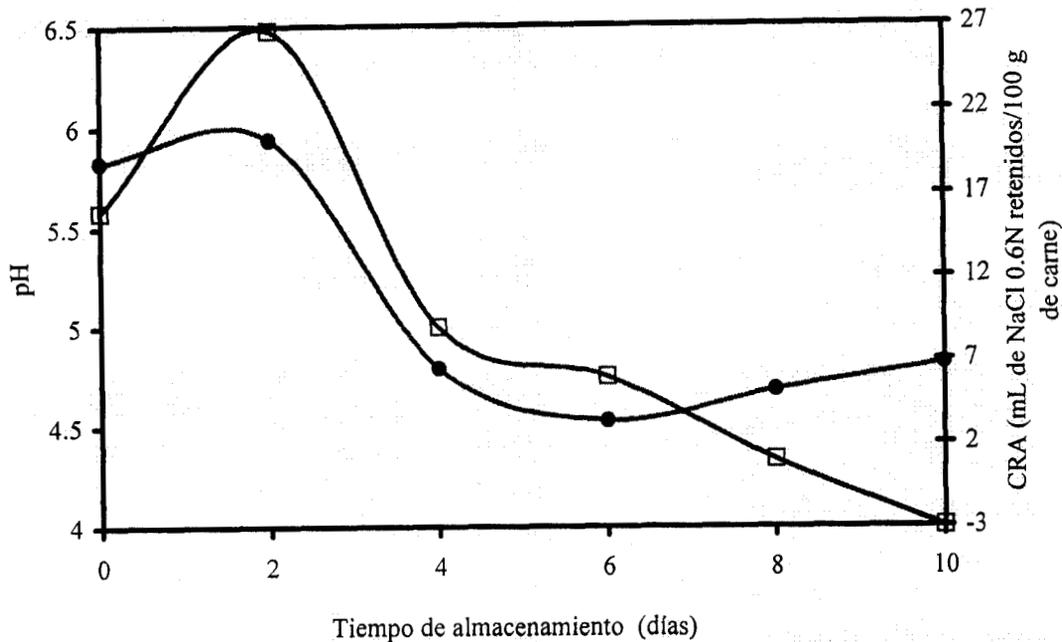
**Tabla 6.17.** Variación la capacidad de retención de agua ( mL de NaCl 0.6 M retenidos/100 g de carne), en el músculo de pollo inoculado por inmersión con cultivos bioprotectores o nisina en presencia de 2.5 y 5% de sacarosa y almacenado a 10°C.

	Sacarosa 2.5%				Sacarosa 5%			
	Testigo	Nisina	<i>S. carnosus</i> MC-1-02055	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454	Testigo	Nisina	<i>S. carnosus</i> MC-1-02055	<i>L. lactis</i> subs. <i>lactis</i> ATCC 11454
Día								
0	30	30	30	30	30	30	30	30
2	17 ± 4	16 ± 6	18 ± 1	9 ± 8	20 ± 6	18 ± 3	19	4
4	13 ± 4	18 (ND)	13 (ND)	8 ± 4	10 ± 8	16 ± 3	14	0
8	17 <sup>b</sup> ± 1	30 <sup>c</sup> ± 8	10 <sup>b</sup> (ND)	-7 <sup>a</sup> ± 1	1 <sup>c</sup>	9 <sup>D</sup> ± 1	-21 <sup>A</sup> ± 6	-11 <sup>B</sup> ± 1
Promedio	19.2 <sup>b</sup>	23.5 <sup>c</sup>	17.7 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>	15.2 <sup>C</sup>	18.2 <sup>C</sup>	10.5 <sup>B</sup>	5.7 <sup>A</sup>

\* Medias con la misma letra no presentan diferencia significativa. Cada número es la media de dos muestras diferentes. Cada muestra fue analizada por duplicado.

La CRA de la carne puede ser afectada por diversos factores entre los que destacan los cambios *post-mortem*, las sales y por supuesto el pH (Ponce y col., 2000). Es por ello que con el fin de explicar la disminución de la CRA en músculo de pollo en función del pH, se ha trazado una grafica con los valores de pH y CRA obtenidos en un testigo adicionado con 5% de sacarosa (Figura 6.11). En la figura 6.11 se puede ver que al disminuir el pH, disminuye CRA de la carne. Por ejemplo en el día 2 se observó un ligero aumento en el pH y por consiguiente en la CRA. No obstante, a partir de este punto y hasta el día 10, se observa una disminución en la CRA, lo cual resulta lógico ya que si bien a partir del día 8 se tuvo un ligero aumento en el pH éste se encuentra alrededor de 5.0. La CRA de la carne tiene un valor mínimo a un pH de 5.0, el cual coincide con el punto isoeléctrico (PI) de las proteínas miofibrilares (Ponce y col., 2000). En este punto, se favorecen las interacciones entre proteínas, lo cual provoca la disminución de las interacciones entre el agua (Ponce y col., 2000). La reducción de la CRA por debajo del pH a valores alejados del punto isoeléctrico de

las proteínas miofibrilares podría haber sido ocasionado por la hidrólisis de las proteínas debido a la presencia de proteasas ácidas.



**Figura 6.11** Evolución del pH y la CRA durante el almacenamiento a 10°C en las muestras testigo (sin inóculo), 5% de sacarosa. Símbolos: ●= pH y ○= CRA

### 6.5.3. Producción de ácidos orgánicos de cadena corta

La fermentación láctica genera sabores y olores característicos, algunos debidos a la presencia de ácidos orgánicos de cadena corta como el ácido láctico, acético, propiónico, diacetilo, etc (Lücke, 2000), los cuales, en muchas ocasiones son muy apreciados en la elaboración de productos cárnicos. Sin embargo, la producción de tales compuestos podría tener algún impacto sobre el sabor y el olor de la carne en las carnes frescas y por lo tanto afectaría la aceptación por parte del consumidor.

La evaluación de la producción de algunos ácidos orgánicos de cadena corta se realizó únicamente en aquellas muestras inoculadas en presencia de 2.5% de sacarosa debido a que en éstas los cambios en el pH, ATT, CRA fueron menos dramáticos que al emplear 5% de sacarosa

### 6.5.3.1 Producción de ácido láctico

En la tabla 6.18 se observa un aumento en la cantidad de ácido láctico especialmente en los días 6 y 8 de almacenamiento, independientemente del tipo de inóculo. Sin embargo, el análisis estadístico reveló que únicamente las muestras inoculadas con *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 produjeron niveles de ácido láctico promedio significativamente mayores ( $P > 0.0001$ ) que el testigo (Tabla 6.18): 683.57 y 615.53 mg de ácido láctico/100 g de carne, respectivamente.

Estudios realizados por Kakouri y Nychas (1994) en pechuga de pollo empacada al vacío y almacenada a 10°C mostraron que durante el almacenamiento existe una reducción en la concentración ácido láctico y atribuyeron este comportamiento a la utilización de este metabolito en forma de lactato por la microflora de la carne. Este fenómeno ya había sido observado por Borch y Agerhem en 1992 (citado (Kakouri y Nychas, 1994) en carne de vacuno almacenada en condiciones anaeróbicas. En nuestro estudio aunque la concentración inicial de ácido láctico (594.74 mg de ácido láctico/100 g de carne) se encontró dentro del mismo orden de magnitud de lo reportado por Kakouri y Nychas (1994) (679 mg/100 g de carne). Sin embargo, a diferencia de lo observado por estos autores y por Borch y Agerhem, la producción de ácido láctico aumentó aproximadamente entre 80 y 150 mg/100 g de carne en los distintos inóculos durante el almacenamiento. Este comportamiento resulta lógico ya que mediante el empleo de vacío y se favoreció el desarrollo de los cultivos bioprotectores, así como la producción de sus metabolitos, entre ellos el ácido láctico.

### 5.5.3.2. Producción de ácido acético

Al inicio del almacenamiento se determinó que la carne de pollo se encontraba libre de ácido acético, pero a partir del día 2 se inició la producción en todas las muestras excepto en las inoculadas en presencia de nisina, en las cuales la formación de ácido acético se determinó hasta el día 6. Durante el almacenamiento la concentración de ácido acético se incrementó considerablemente, no obstante, al realizar el análisis estadístico de los datos se determinó que las muestras inoculadas en presencia de cultivos bioprotectores o nisina no produjeron cantidades de ácido acético significativamente diferentes ( $P>0.101$ ) a las producidas en el testigo.

La concentración de ácido acético en la carne de pollo se incrementó durante el almacenamiento independientemente de inóculo. Estos resultados coinciden con lo observado por Kakouri y Nychas (1994). También observaron que después de 8 días a 10°C de almacenamiento en el músculo de pollo empacado al vacío se producían cerca de 100 mg de ácido acético/100 g de carne. En nuestro caso el testigo, así como las muestras inoculadas con nisina, *S. carnosus* y *L. lactis* produjeron 65.55, 102.88, 81.43 y 116.17100 mg de ácido acético/100 g de carne, respectivamente. El hecho de que no se encontrara diferencia significativa ( $P>0.101$ ) en la concentración promedio de ácido acético en los distintos inóculos con respecto al testigo podría deberse a la gran desviación estándar mostrada en cada determinación (Tabla 6.18). Finalmente, el incremento en la concentración de ácido acético en el testigo y en las muestras inoculadas con nisina podría haber sido producido por las BAL nativas y otros microorganismos capaces de crecer en anaerobiosis tales como *Brochotrix thermosphacta*. Mientras tanto, el incremento en concentración de ácido acético en las muestras inoculadas con *S. carnosus* y *L. lactis* podría haber sido ocasionado básicamente por las BAL nativas debido a que *B. thermosphacta* es incapaz de crecer en condiciones anaeróbicas cuando el pH de la carne es inferior a 5.8 (Jackson y col., 1997).

**Tabla 6.18.** Cambios ocurridos en los niveles de ácido láctico y acético (mg/100 g de carne) durante el almacenamiento de carne de pollo inoculado por inmersión con cultivos bioprotectores o nisina en presencia de 2.5 de sacarosa y almacenado a 10°C.

Día	Ácido láctico (mg/100 g de carne)				Ácido acético (mg/100 g de carne)			
	Testigo	Nisina	<i>S. carnosus</i> MC-1-02055	<i>L. lactis</i> subs <i>lactis</i> ATCC 11454	Testigo	Nisina	<i>S. carnosus</i> MC-1-02055	<i>L. lactis</i> subs <i>lactis</i> ATCC 11454
0	594.74 ±3.74	594.74 ±3.74	594.74 ±3.74	594.74 ±3.74	0 -	0 -	0 -	0 -
2	598.65 ±7.77	641.50 -	600.11 ±12.43	660.81 ±86.5	4.91 -	0.00 -	28.20 -	14.76 -
4	583.74 ±41.80	598.59 ±7.12	634.55 ±8.31	687.52 -	27.84 ±8.33	13.65 -	44.75 ±8.51	24.53 ±8.51
6	656.65 -	629.75 -	628.81 ±15.12	715.76 ±1.76	53.64 32.60	29.51 ±2.64	48.78 -	40.21 -
8	643.86 ±7.12	671.99 ±17.38	698.90 ±10.68	758.99 ±70.28	65.55 ±32.08	102.88 ±13.14	81.43 ±31.30	116.17 ±31.30
<b>Promedio</b>	<b>615.53<sup>a</sup></b>	<b>627.31<sup>a</sup></b>	<b>631.42<sup>a</sup></b>	<b>683.57<sup>b</sup></b>	<b>17.28</b>	<b>8.63</b>	<b>24.35</b>	<b>15.90</b>

\*Entre medias con la misma letra no presentan diferencia significativa. Cada número es la media de dos muestras. Cada muestra fue analizada por duplicado

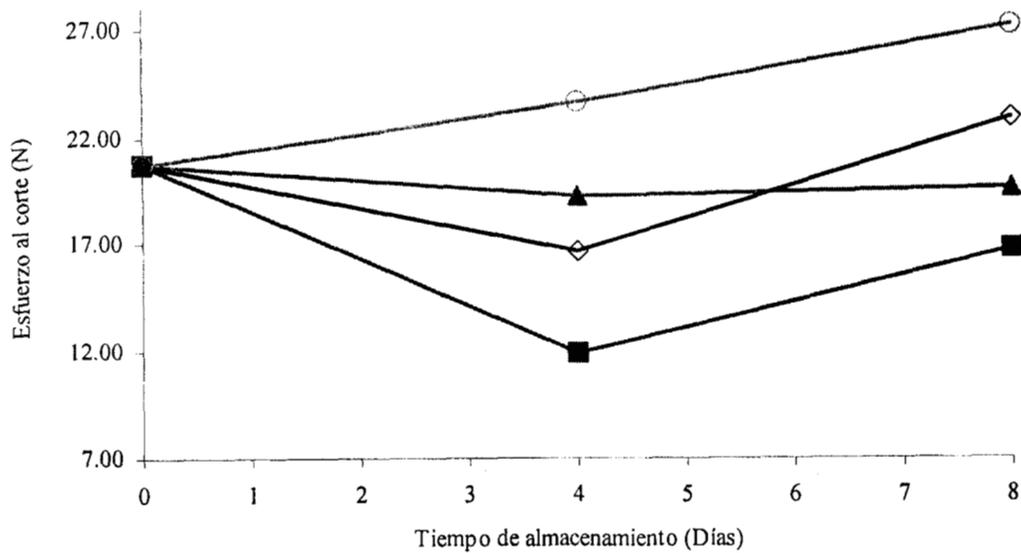
#### 6.5.4. Efectos sobre textura

Los cambios en la textura de la carne de pollo ocasionados por el empleo de cultivos bioprotectores o nisina se determinaron mediante la realización de pruebas de esfuerzo al corte. Los cambios en la textura se monitorearon en las muestras inoculadas con 2.5 y 5% de sacarosa a los 0, 4 y 8 días de almacenamiento (Figuras 6.12 y 6.13). En la figura 6.12 se observa que en general, las muestras inoculadas en presencia de 2.5% de sacarosa mostraron cambios más graduales en el esfuerzo al corte (Tabla 6.19). Pero las muestra inoculadas con *L. lactis* mostraron un incremento en el esfuerzo al corte desde el inicio del almacenamiento (20.72 N) y hasta el día 8 (27.18 N). Mientras tanto, en el testigo y en las muestras inoculadas con *S. carnosus* disminuyó el esfuerzo al corte en el día 4 a 11.96 N y 16.68 N, respectivamente. Para el día 8 el esfuerzo al corte en ambas muestras fue de 16.73 N y 22.92 N. Finalmente, en las muestras inoculadas con nisina el esfuerzo al corte permaneció más o menos constante durante el almacenamiento. Con respecto a las muestras tratadas en presencia de 5% de sacarosa (6.13 N) se observa una rápida disminución en el esfuerzo al corte en el día 4, independientemente del inóculo. En este caso, el esfuerzo al corte pasó de 20.7 N al inicio del almacenamiento, a valores entre 11 y 13 N en el día 4. Posteriormente, en el día 8 se muestra un incremento de entre 5 y 15 N. Las muestras tratadas con *L. lactis* presentaron valores de esfuerzo al corte significativamente mayores ( $P>0.0001$ ) con respecto al testigo.

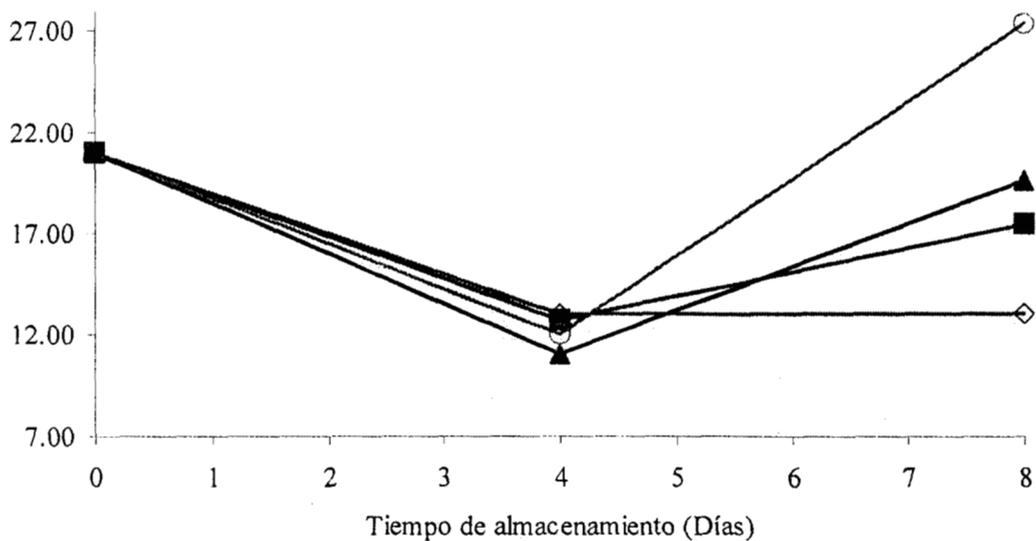
Existen varios estudios relacionados con el empleo de cultivos bioprotectores y de bacteriocinas para mejorar la calidad microbiológica de la carne (Mahadeo y Tatini, 1994; Aymerich y Hugas, 1998; Bredholt y col., 1999). Sin embargo, muy pocos estudios son integrales en los cuales además de estudiar la utilidad de los cultivos bioprotectores contra de bacterias de interés, se estudie su impacto sobre las características de calidad de la carne incluyendo color y textura. En este sentido Guidolin y col. (1998) utilizaron *Lactobacillus alimentarius* para inhibir microorganismos indeseables sobre la superficie de las canales de pollo almacenadas al vacío, al mismo tiempo estudiaron el impacto sobre las cualidades sensoriales entre ellos la textura de la carne. Estos estudios se realizaron con un panel sensorial que determinó que las muestras tratadas con *L. alimentarius* no presentaron cambios

significativos en la textura con respecto al control. En nuestro caso, los cambios en la textura se determinaron a través de un texturómetro.

En éste estudio el incremento al esfuerzo al corte durante el almacenamiento podría haber sido causado por la reducción del pH, lo cual trajo consigo la pérdida en la CRA de las proteínas miofibrilares (Sección 6.5.1 y 6.5.2). El hecho de que en el cuarto día de almacenamiento se presentara una disminución gradual en el esfuerzo al corte, podría deberse a la proteólisis del músculo debido a la acción de las proteasas endógenas es decir, calpaínas y catepsinas (Price y Schweigert, 1981). En el día 8 se observó un aumento en el esfuerzo al corte el cual podría estar relacionado con la disminución en la capacidad de retención del agua y ésta a su vez, con el pH. La reducción del pH ocasiona la disminución la CRA y de tal manera que la carne tiende a ser más seca y por lo tanto, ésta presentará una mayor esfuerzo al corte (Hultin, 1993; Murphy y Marks, 2000). Esta es la razón por la cual las muestras tratadas con *L. lactis* presentaron esfuerzos al corte significativamente mayores ( $P>0.0001$ ) que el testigo tanto en presencia de 2.5 como con 5% de sacarosa. El hecho de que las muestras tratadas con *S. carnosus*, en presencia de 5% de sacarosa, no presentaran diferencia significativa ( $P>0.826$ ) en el esfuerzo al corte promedio sugiere que este microorganismo puede emplearse en la biopreservación del pollo sin causar daños significativos en la textura. En el caso de *L. lactis* habría que determinar a que concentraciones de sacarosa afecta mínimamente la textura de la carne de pollo, claro sin perder su carácter inhibitorio. Las muestras tratadas con nisina (17.19 N) también produjeron cambios no significativos ( $P>0.126$ ) con respecto al testigo (17.3 N) en el esfuerzo al corte promedio cuando la concentración de sacarosa fue de 5%. En las muestras con 2.5% de sacarosa las muestras tratadas con nisina (19.86 N) mostraron valores promedio de esfuerzo al corte significativamente mayores ( $P>0.0001$ ) que el testigo (16.47 N). Este resultado es un poco extraño ya que debido a la presencia de una menor concentración de sacarosa se esperaba una menor producción de ácido láctico. No obstante, la desviación estándar en este caso fue muy grande. Esto podría haber afectado en gran medida el análisis aún cuando los valores observados con nisina se encuentren cerca del testigo.



**Figura 6.12.** Variación del esfuerzo al corte durante el almacenamiento a 10°C, de la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de BAL o nisina y 2.5% de sacarosa. Símbolos: ■= testigo, ▲= nisina, ◊= *S. carnosus* MC-1-02055 y ○=*L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454



**Figura 6.13.** Variación del esfuerzo al corte durante el almacenamiento a 10°C, de la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de BAL o nisina y 5% de sacarosa. Símbolos: ■= testigo, ▲= nisina, ◊= *S. carnosus* MC-1-02055 y ○=*L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454

**Tabla 6.19.** Variación en el esfuerzo al corte (N) durante el almacenamiento de carne de pollo inoculado por inmersión con cultivos bioprotectores o nisina en presencia de 2.5 y 5% de sacarosa y almacenado a 10°C.

Día	<u>Sacarosa 2.5%</u>				<u>Sacarosa 5%</u>			
	Testigo	Nisina	<i>S. carnosus</i> MC-1- 02055	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454	Testigo	Nisina	<i>S. carnosus</i> MC-1- 02055	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454
0	20.72 ± 1.95	20.72 ± 1.95	20.72 ± 1.95	20.72 ± 1.95	21.02 ± 1.45	21.02 ± 1.45	21.02 ± 1.45	21.02 ± 1.45
4	11.96 ND	19.23 ± 0.42	16.68 ± 1.58	23.59 ± 1.30	12.72 ± 0.51	11.05 ± 0.54	13.03 ± 0.44	11.97 ± 1.62
8	16.73 <sup>a</sup> ± 2.18	19.62 <sup>a</sup> ± 6.20	22.92 <sup>ab</sup> ± 2.39	27.14 <sup>b</sup> ± 0.45	17.38 <sup>AB</sup> ND	19.51 <sup>B</sup> ± 0.71	13.03 <sup>A</sup> ± 5.32	27.18 <sup>C</sup> ± 0.45
<b>Promedio</b>	<b>16.47<sup>a</sup></b>	<b>19.86<sup>b</sup></b>	<b>20.11<sup>b</sup></b>	<b>23.82<sup>c</sup></b>	<b>17.03<sup>A</sup></b>	<b>17.19<sup>A</sup></b>	<b>15.68<sup>A</sup></b>	<b>19.11<sup>B</sup></b>

\*Entre medias con la misma letra no presentan diferencia significativa. Cada número es la media de dos muestras. Cada muestra fue analizada por duplicado. ND= Desviación estándar no determinada.

### 6.5.5. Efecto sobre proteínas miofibrilares

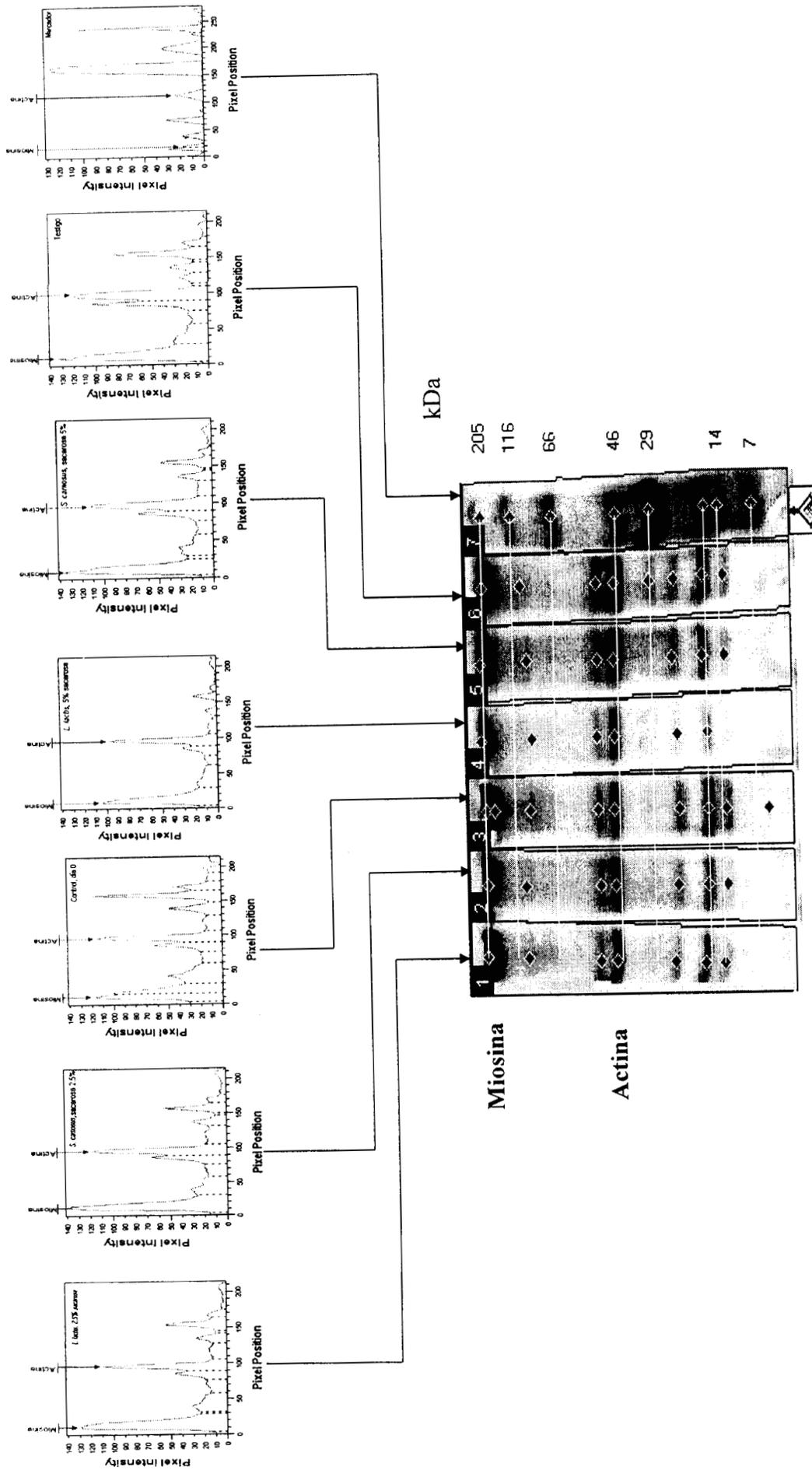
En la carne fresca la integridad de las proteínas miofibrilares tienen una gran influencia sobre el color, la textura y las propiedades funcionales (Liu y col, 1996). Dado que el estado de las proteínas miofibrilares afecta en gran medida varias propiedades funcionales de la carne se procedió dar un seguimiento del perfil electroforético durante el almacenamiento.

El perfil electroforético de las proteínas miofibrilares obtenido por electroforesis SDS-PAGE reductora como se muestra en las figuras 6.14 y 6.15. En general, después de 8 días de

almacenamiento, la degradación de la cadena pesada de miosina fue más evidente que a los 4 días. Por su parte la actina permaneció intacta aún después de 8 días de almacenamiento.

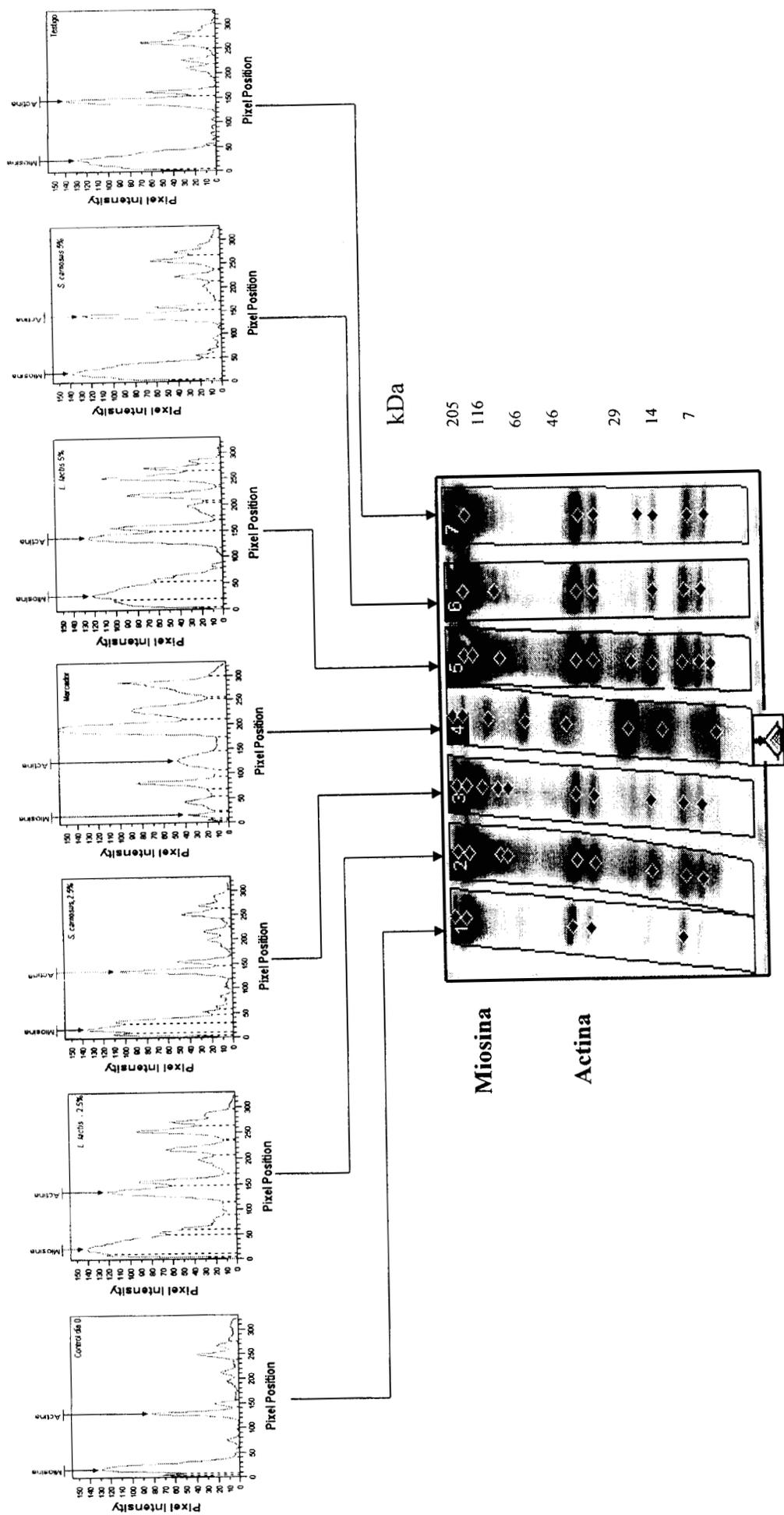
En el día 4 las muestras tratadas con *L. lactis* adicionadas con 5% de sacarosa presentaron una mayor degradación de la miosina que aquellas adicionadas con 2.5%. Además, en las muestras tratadas con *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 (Figura 6.15, líneas 2 y 5) se produjo una mayor degradación de la miosina que en el testigo (Figura 6.15, línea 7) y en las muestras inoculadas con *S. carnosus* (figura 6.15, líneas 3 y 6). La degradación de la miosina en las muestras inoculadas con *L. lactis*, nuevamente fue mayor cuando la concentración de sacarosa en el inóculo fue de 5% (Figura 6.15, líneas 2 y 5)

En productos cárnicos, como los embutidos secos, la proteólisis resulta de la acción combinada de las enzimas endógenas y de aquellas producidas por los microorganismos (Fadda y col., 1999 a y b). En éste caso, la degradación de la miosina podría haber sido causada, en principio, por la acción de las catepsinas (Fadda y col., 1999a y b) y por la disminución del pH. Sin embargo, al final del almacenamiento la degradación podría haber sido causada por la presencia de proteasas microbianas (Fadda y col., 1999a y b) y también por el pH. En este caso, es de notar que las muestras inoculadas con *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 en presencia tanto de 2.5 como 5% de sacarosa fueron las que presentaron menores valores de pH y con ello grandes cambios en la CRA. Estos comportamientos fueron mucho más evidentes cuando la adición de sacarosa fue del 5% probablemente por un mayor crecimiento de la microflora tanto nativa como adicionada.



**Figura 6.14.**

Perfil electroforético SDS-PAGE de las proteínas miofibrilares de la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de BAL, almacenada a 10°C durante 4 días: (1) *L. lactis* 2.5%, (2) *S. carnosus* 2.5%, (3) Control día 0, (4) *L. lactis* 5%, (5) *S. carnosus* 5%, (6) Testigo y (7) Marcador.



**Figura 6.15**

Perfil electroforético SDS-PAGE de las proteínas miofibrilares de la carne de pollo, inoculada por inmersión en una suspensión de BAL, almacenada a 10°C durante 8 días: (1) Control día cero, (2) *L. lactis* 2.5%, (3) *S. carnosus* 2.5%, (4) Marcador, (5) *L. lactis* 5%, (6) *S. carnosus* 5% (7) Testigo

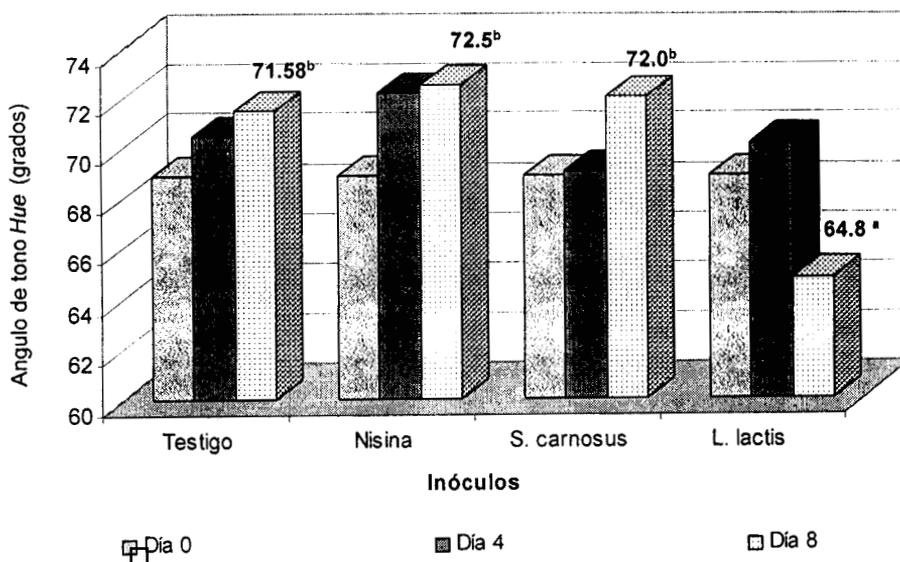
### 6.5.5. Efectos sobre el color

El color es una de las principales propiedades sensoriales, ya que determina en gran medida el grado de aceptación de cualquier alimento por parte de los consumidores. El color de la carne puede ser afectado por la cantidad y el tipo de pigmentos presentes, por la estructura de las proteínas musculares, el contenido de grasa y el pH (Pérez-Álvarez y col., 2000). La estructura juega un papel fundamental en las propiedades ópticas y por consiguiente en el color de la carne. La mayor contribución a la dispersión de la luz en las fibras blancas corresponde a las miofibrillas, de tal manera que la alteración del volumen de las miofibrillas afecta en gran medida el grado de dispersión. Se ha observado que cuando el volumen de la miofibrilla es mínimo, hay una mayor dispersión de la luz, mientras que en el caso contrario hay una disminución de la dispersión de la luz (Pérez-Álvarez y col., 2000).

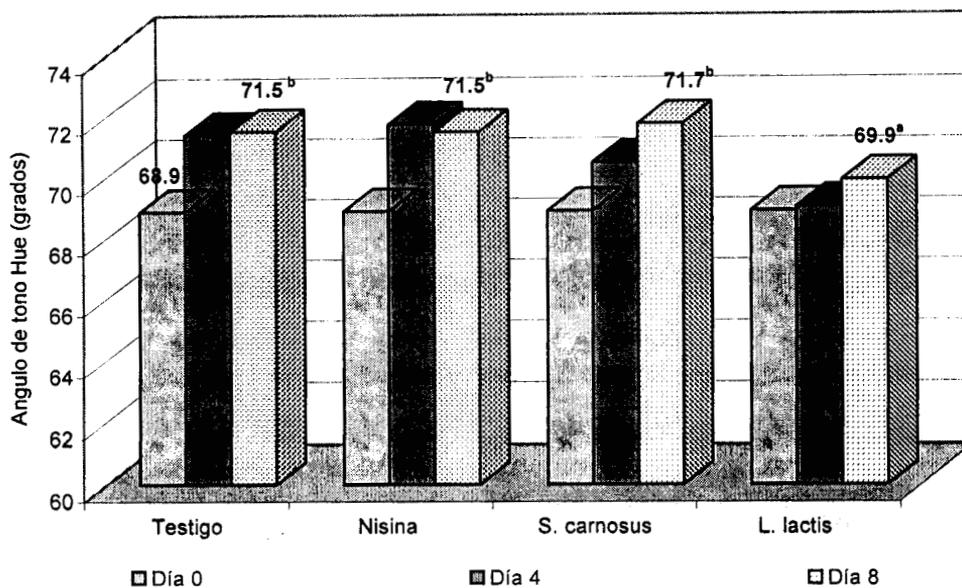
#### 6.5.5.1. Tonalidad o Angulo de tono (*Hue*)

Ángulos de tono (*Hue*) entre 0° y 90° mostraran colores entre amarillo y rojo. De acuerdo con los registros del ángulo de tono obtenidos, los valores obtenidos fueron menores de 90° en todos los casos independientemente de la concentración de sacarosa adicionada a los inóculos. Además, se observó un incremento significativo en los valores *Hue* después de 8 días de almacenamiento es decir, hubo un “anaranjamiento” sobre la superficie del músculo. En las figuras 6.16 y 6.17 se visualiza la evolución en los promedios de tres observaciones de valores de ángulo de tono durante el almacenamiento del músculo de pollo.

Al realizar un análisis estadístico de los datos se determinó que después de 8 días de almacenamiento las muestras tratadas con *L. lactis* fueron las únicas que presentaron valores del ángulo de tono significativamente ( $P > 0.0001$ ) menores que el testigo, tanto en presencia de 2.5 como con 5% de sacarosa (Figura 6.16 y 6.17).



**Figura 6.17** Evolución de la tonalidad durante el almacenamiento a 10°C de la carne de pollo inoculada en una suspensión cultivos bioprotectores o nisina 5% de sacarosa (Nota: Superíndices con la misma letra no presentan diferencias significativas)



**Figura 6.17** Evolución de la tonalidad durante el almacenamiento a 10°C de la carne de pollo inoculada en una suspensión cultivos bioprotectores o nisina 2.5% de sacarosa (Nota: Superíndices con la misma letra no presentan diferencias significativas)

### 6.5.5.2. Cromaticidad o pureza del color (*Chroma*)

La cromaticidad, también llamada matiz, describe el atributo que uno conoce como color (amarillo, verde, azul o rojo). En las figuras 6.18 y 6.19 se visualiza que tanto para el testigo como para las muestras inoculadas con nisina hay una disminución significativa en la cromaticidad al cabo de 8 días de almacenamiento. Este comportamiento fue totalmente diferente para las muestras inoculadas con bacterias lácticas ya que en este caso se observó que la cromaticidad aumentó en el caso de *S. carnosus* y se mantuvo constante *L. lactis*.

Aquellas muestras inoculadas con nisina (28.35), *L. lactis* (30.54), o *S. carnosus* (33.55) en presencia de 5% de sacarosa, mostraron un aumento significativo ( $P > 0.0001$ ) en la cromaticidad después de 8 días de almacenamiento, comparadas con el testigo (27.05). Por otra parte, se encontró diferencia entre *S. carnosus* y *L. lactis* y entre *S. carnosus* y nisina (Anexo 4d).

En las muestras inoculadas en presencia de 2.5% de sacarosa, la tendencia y los valores de *Chroma* fueron muy similares a los mostrados con 5% de sacarosa, sólo que en este caso, no se observó diferencia significativa entre los valores de cromaticidad promedio en el testigo (27.91) y las muestras tratadas con nisina (27.91). Además, los valores de cromaticidad mostrados por *L. lactis* (30.17) y *S. carnosus* (32.16) fueron significativamente mayores ( $P > 0.0001$ ) a los observados en el testigo. Esto significa que el empleo de bacterias lácticas acentuó el color (mayores valores en la pureza del color) en la carne de pollo al cabo de 8 días de almacenamiento.

Hay que hacer notar que estos resultados nuevamente podrían estar asociados a la reducción de pH el cual, podría afectar de manera negativa la CRA y con ello el volumen de las miofibrillas dando como resultado una mayor dispersión de la luz. En este sentido, las muestras inoculadas con bacterias lácticas desarrollaron valores de pH por debajo del testigo y de las muestras inoculadas con nisina. La presencia de BAL con la consiguiente reducción del pH podría haber inhibido microorganismos causantes de deterioro del color tales como *Pseudomonas*.

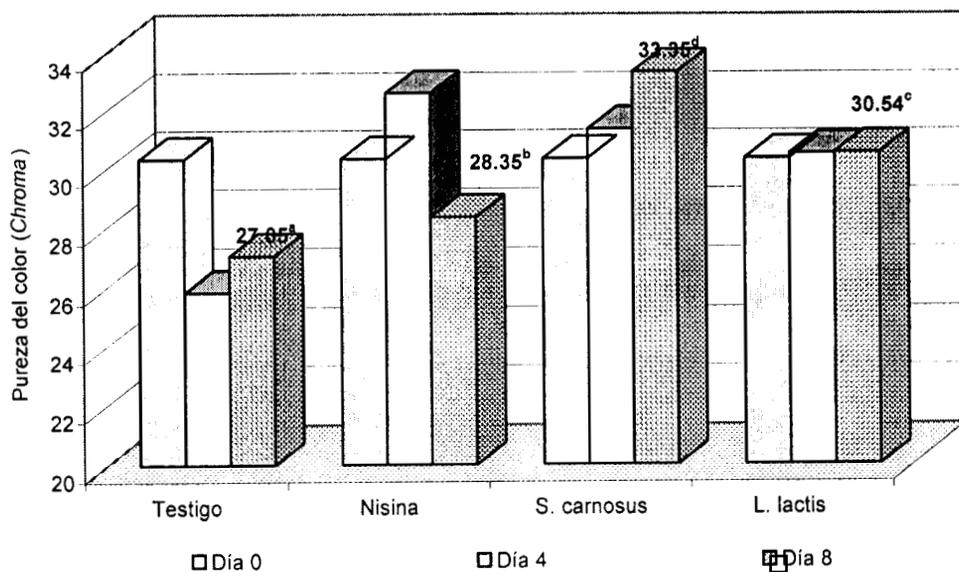


Figura 6.18 Variación de la cromaticidad durante el almacenamiento a 10°C de la carne de pollo inoculada por inmersión con cultivos bioprotectores o nisina y 5% de sacarosa (Nota: Superíndices con la misma letra no presentan diferencias significativas)

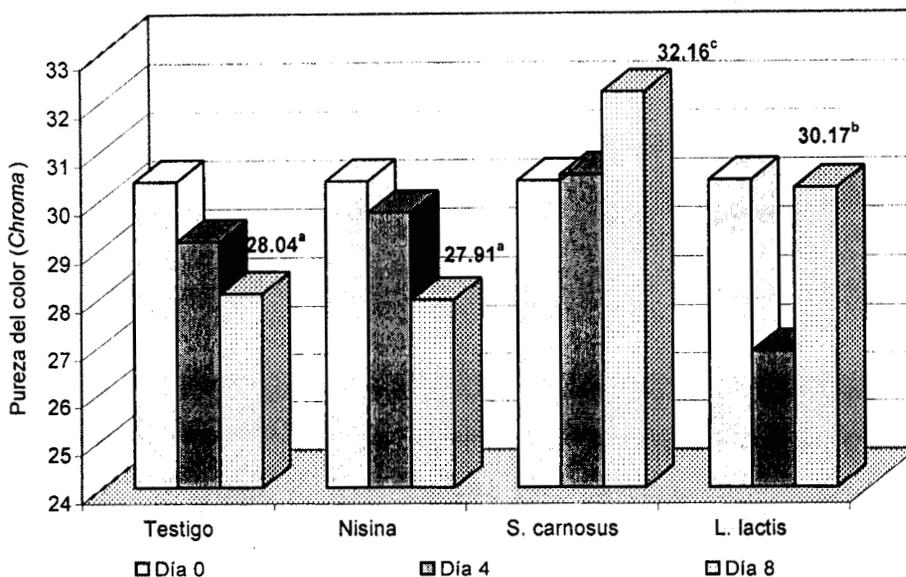


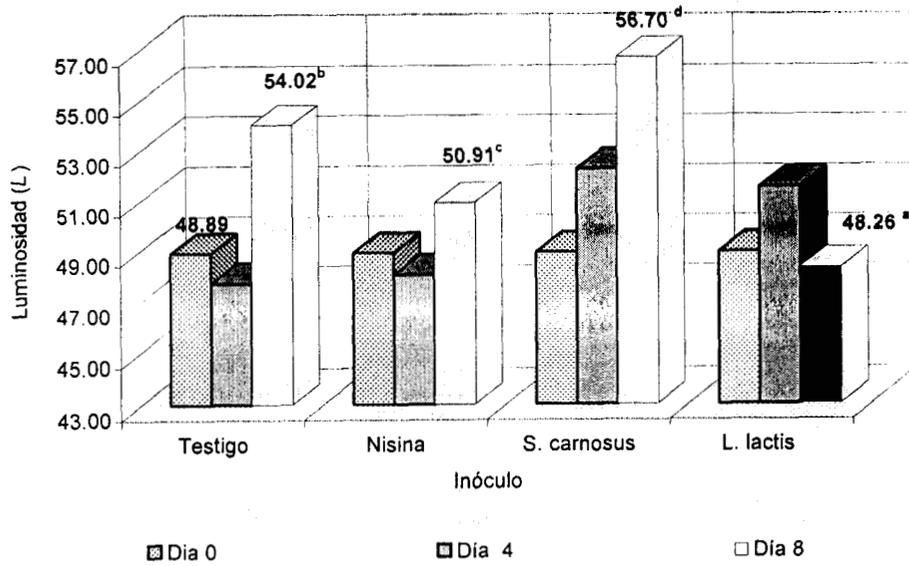
Figura 6.19. Variación de la cromaticidad durante el almacenamiento a 10°C de la carne de pollo inoculada por inmersión con cultivos bioprotectores o nisina y 2.5% de sacarosa (Nota: Superíndices con la misma letra no presentan diferencias significativas)

#### 3.5.5.4. Luminosidad (*L*)

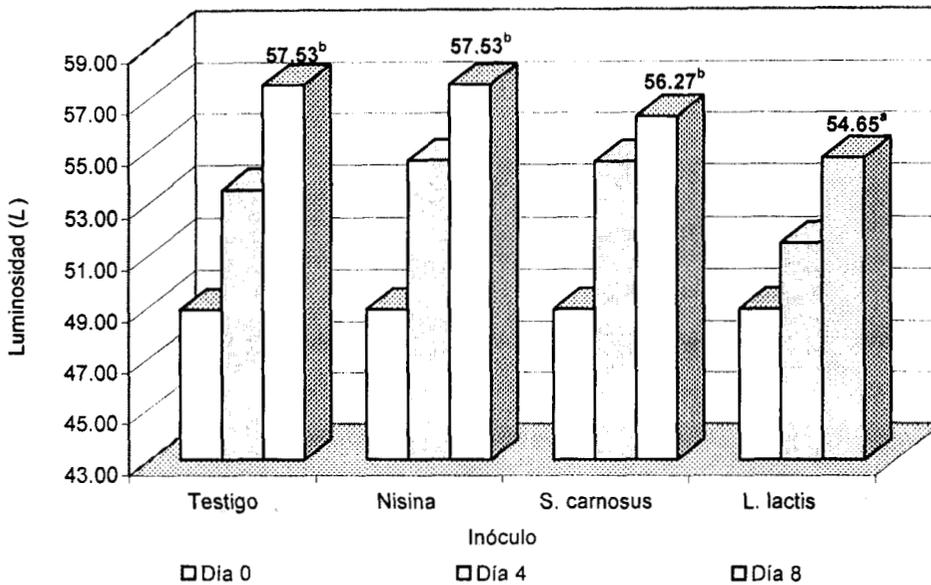
La luminosidad o brillo es una medida del índice de reflectancia de la luz del color (Wheeler y col., 1993) y toma valores entre 0 (negro) a +100 (blanco). En la carne, los valores de la coordenada de luminosidad o brillantez (*L*) varían al igual que los demás parámetros de color con el contenido de mioglobina de cada especie. En este sentido, se ha observado que la ternera con 15 mg/g de mioglobina presenta valores *L* alrededor de 30-35. Por su parte la carne de pollo con 3 mg/g de mioglobina tiene valores entre 45-50 (Pérez Álvarez y col., 2000).

En las figuras 6.20 y 6.21, se observa un incremento significativo ( $P > 0.0001$ ) en la luminosidad (*L*) durante el almacenamiento, es decir, hubo una decoloración sobre la superficie de la carne. Esto podría deberse a la desnaturalización de las proteínas miofibrilares y sarcoplámicas debido a la reducción del pH (Ogden y col., 1995) lo cual generó una mayor dispersión de la luz (Pérez Álvarez y col., 2000).

Con 5% de sacarosa el valor promedio más alto de luminosidad después de 8 días de almacenamiento fue alcanzado en las muestras inoculadas con *S. carnosus* (56.7), seguidos por nisina (54.0), el testigo (50.91) y finalmente las muestras tratadas con *L. lactis* (48.26) (Figura 6.20). Este comportamiento podría deberse a la reducción significativa del pH. Por otra parte, el incremento de la luminosidad en la carne de pollo se muestra más marcado en las muestras que contienen 2.5% de sacarosa (Figura 6.21). En este caso, no se observó diferencia significativa ( $P > 0.116$ ) en los valores de luminosidad después de 8 días de almacenamiento en las muestras inoculadas ya sea con nisina, *S. carnosus* y el testigo. No obstante, los valores de luminosidad producidos con *L. lactis* fueron significativamente menores ( $P > 0.0001$ ) que los observados en el testigo. Estos resultados coinciden con lo reportado por Ogden y col. (1995), quienes observaron una disminución en los valores de luminosidad al aumentar la concentración de ácido láctico.



**Figura 6.20** Variación en luminosidad (*L*) de la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de cultivos bioprotectores o nisina y 5% de sacarosa y almacenada a 10°C (Nota: Superíndices con la misma letra no son estadísticamente diferentes)

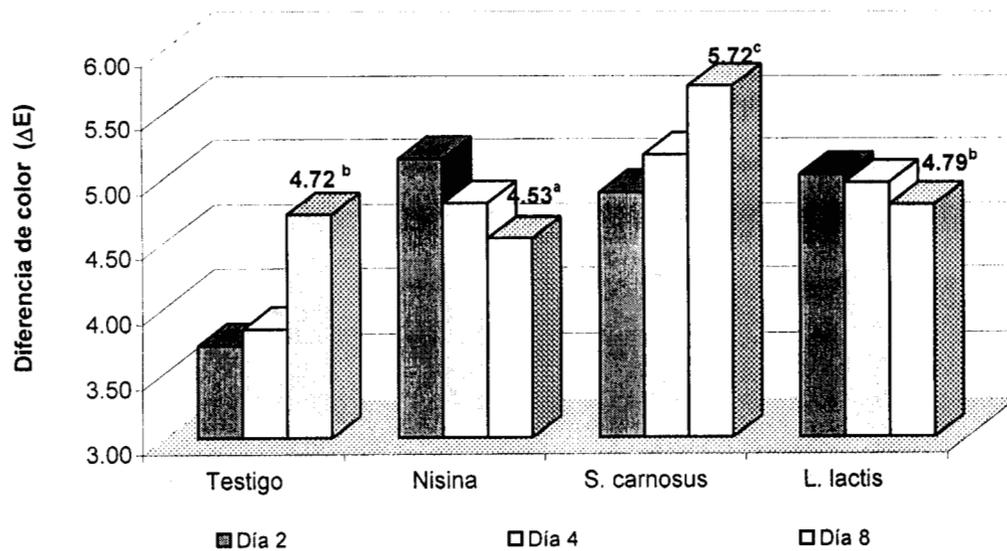


**Figura 6.21** Variación en luminosidad (*L*) de la carne de pollo inoculada por inmersión en una suspensión de cultivos iniciadores o nisina y 2.5% de sacarosa, y almacenada a 10°C (Nota: Superíndices con la misma letra no son estadísticamente diferentes)

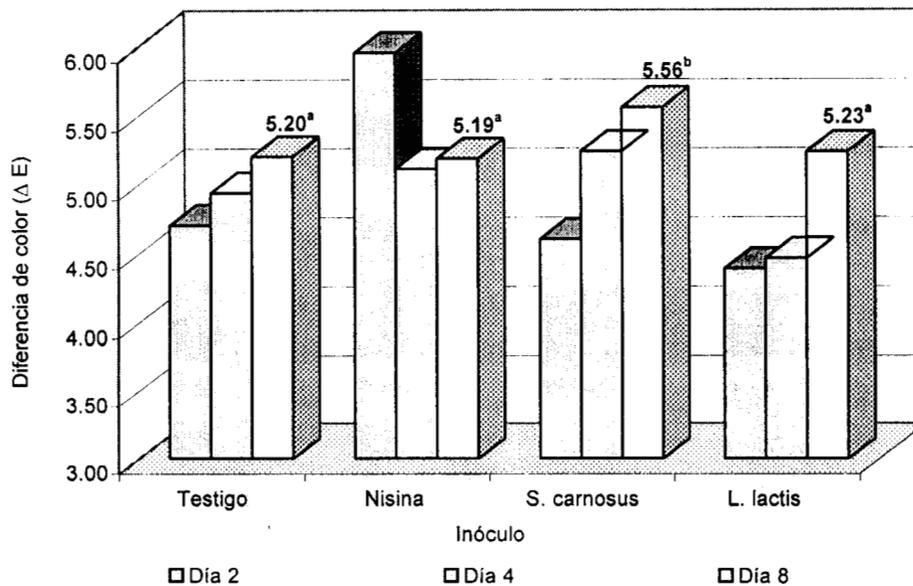
#### 6.5.5.4. Diferencia total de color ( $\Delta E$ )

En las figuras 6.22 y 6.23 se muestran las variaciones en la diferencia de color del músculo de pollo durante el almacenamiento. En la figura 6.16 (sacarosa 5%), se observa que las muestras inoculadas con bacterias lácticas o nisina mostraron valores mayores en la diferencia de color que el testigo durante los primeros 4 días de almacenamiento. No obstante, a los 8 días, se observó que las muestras tratadas con *S. carnosus* (5.72) presentaron cambios en la diferencia total de color significativamente mayores ( $P > 0.0001$ ) que el testigo (4.72), *L. lactis* (4.79) y nisina (5.15). Además, no se observó diferencia significativa entre los valores promedio de  $\Delta E$  del testigo y *L. lactis*.

En presencia de 2.5% de sacarosa (figura 6.23) el comportamiento de  $\Delta E$  es muy similar que con 5% de sacarosa, es decir, hay un incremento en  $\Delta E$  durante el almacenamiento. Sin embargo, los valores alcanzados con 2.5% de sacarosa en todos los inóculos son mayores que aquellos observados con 5% (Figura 6.22). Esto podría atribuirse a una mayor inhibición de microorganismos contaminantes capaces de alterar la estructura muscular y con ello las propiedades ópticas de la carne. Por otra parte, después de 8 días de almacenamiento, las muestras inoculadas con *L. lactis* (5.55) presentaron valores significativamente menores en  $\Delta E$  que el testigo (5.20), nisina (5.18) y *S. carnosus* (5.23). Tampoco se observó diferencia significativa ( $P > 0.671$ ) en  $\Delta E$  del testigo y las muestras inoculadas con nisina o *S. carnosus*.



**Figura 6.22.** Comportamiento de  $\Delta E$  durante el almacenamiento a 10°C de la carne de pollo inoculada en presencia de cultivos iniciadores o nisina y 5% de sacarosa. (Nota: Superíndices con la misma letra no son estadísticamente diferentes)



**Figura 6.23** Comportamiento de  $\Delta E$  durante el almacenamiento a 10°C de la carne de pollo inoculada en presencia de cultivos iniciadores o nisina y 2.5% de sacarosa. (Nota: Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes)

---

## **7. CONCLUSIONES**

1. De acuerdo con las condiciones empleadas en este estudio, el empleo de cultivos bioprotectores contribuyó a mejorar la calidad microbiológica de la carne de pollo mediante la reducción significativa ( $P>0.0001$ ) las poblaciones de *Listeria*, *Pseudomonas* y coliformes totales. Por otra parte, el empleo de nisina a diferencia de los cultivos bioprotectores, únicamente causó diferencia significativa en la población de *Listeria*. ufc/cm<sup>2</sup>
2. Asimismo, la presencia de cultivos bioprotectores y nisina en el tejido muscular de pollo produjo concentraciones de aminos significativamente menores ( $P>0.0001$ ) que el testigo durante el almacenamiento.
3. En general, adición de cultivos bioprotectores afectó significativamente ( $P>0.0001$ ) los parámetros de calidad del músculo de pollo como son el pH, capacidad de retención de agua, color, textura e integridad de las proteínas miofibrilares, sobre todo cuando la concentración de sacarosa fue de 5%.
4. La presencia de *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 afectó en mayor medida los parámetros de calidad de la carne como son: pH, CRA, color, textura del músculo de pollo que *S. carnosus* MC-1-02055. No obstante, el tratamiento de la carne de pollo con *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 causó una reducción significativamente mayor ( $P>0.0001$ ) en la población de coliformes y *Listeria* que el tratamiento con *S. carnosus* MC-1-02055. Esta reducción fue mucho más evidente cuando la concentración de azúcar a los inóculos fue de 5%
5. Con respecto a la producción de aminos, la presencia de *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, *S. carnosus* MC-1-02055 y nisina redujeron significativamente la producción de aminos en aquellas muestras inoculadas con una mezcla de cultivos bioprotectores y *P. fluorescens* C 65 o *E. coli* ATCC 8937.

- 
6. La miosina presentó una degradación evidente después de 8 días de almacenamiento, tal degradación fue más evidente en aquellas muestras inoculadas con *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454. Por su parte la actina no presentó signos de degradación aún después de 8 días de almacenamiento, independientemente del inóculo y de la concentración de sacarosa adicionada a los distintos inóculos.
  
  7. Finalmente, tanto *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 como *S. carnosus* MC-1-02055 pueden ser empleados para aumentar la calidad microbiológica de la carne de pollo almacenada en condiciones de abuso de la temperatura. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para establecer la concentración de azúcares fermentables adecuada que permita la inhibición no sólo de pseudomonas, coliformes, o *Listeria* sino también de otros microorganismos capaces de crecer en condiciones anaerobias como *Brochrotrix thermosphacta*, así como retardar la producción de aminas biogénicas. Pero que además, que permita conservar las características de calidad de la carne como son color, textura, y sabor.

---

## ***8. BIBLIOGRAFÍA***

- Agricultural Statistics(2000). Dairy and Poultry Statistics, Estados Unidos.
- Alxesson, L.T. (1993). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology, en Lactic Acid Bacteria. Editores: Salminen S. y Von Wright A. Ed. Mercel Dekker, Inc, New York. pp: 1-63
- Anderson, M.E. y Marshall, R.T. (1990). Reducing microbial populations on beef tissues concentration and temperature of lactic acid . *J. Food Safety*, 10: 181-190.
- Aymerich, M.A. y Hugas, M. (1998). Estado actual de la bioconservación en productos cárnicos. *Eurocarne*, 72: 39-51.
- Baduí, D.S. (1999). Química de Alimentos. Ed. Alhambra Mexicana, México, pp: 123-210.
- Baird-Parker, T.C.(2000). The production of Microbiologically Safe and Stable Foods. En The Microbiological Safety and Quality of Food. Editores Lund B.M., Baird-Parker T.C. y Gould G.W., vol I, pp: 3-18. Ed. Aspen Publishers, Inc, Gaithersburg, Maryland.
- Barnes, E.M. e Impery, C.S. (1968). Psychrophilic Spoilage Bacteria of Poultry . *J. Appl. Bact.* 31: 97-107.
- Barnes, E.M. e Impey, C.S. (1975). The Shelf-Life of Uneviscerated and Eviscerate Chicken Carcasses Stored at 10°C y 4°C. *Br. Poult. Sci.*, 16: 319-326.
- Bell, Ch. y Kyriakides, A. (1998). *Listeria*: A practical to the organism and its control in foods. Ed. Blackie Academic & Professional, Inglaterra, pp: 10-29
- Bhunja, A.K., Johnson, M.C. y Ray, B. (1988). Purification, characterization and antimicrobial spectrum of bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.* 65:261-268.
- Bredhold, S., Nesbakken, T. y Holck, A. (1999). Protective cultures inhibit growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* 0157:H7 in cooked, sliced, vacuum- and gas-packaged meat. *Int. J. Food Microbiol.*, 53:43-52.
- Brul S. y Coote P. (1999). Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.* 50:1-17.
- Bruno, M.E.C. y Montville, T. (1993). Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *App. Environ. Microbiol.*, 59(9):3003-3010
- Campos, C., Mazzotta, A.S y Montville, T.J. (1997). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium psicola* in vacuum-packaged cooked chicken at refrigeration temperatures. *J. Food Safety*. 17: 151-160.

- 
- Caplice, E., Gerald, F. y Fitzgerald, F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 50: 131-149.
- Conner, D.E., Davis, M.A. y Zhang L. (2001). Poultry-borne pathogens: plant considerations. En *Poultry Meat Processing*. Editor Sams, A.R., Ed. CRC Press, Boca Raton, New York, pp: 137-176.
- D'Aoust, J. (1997). *Salmonella* species. En *Food Microbiology: Fundamentals and frontiers*. Editores: Doyle, M.O., Beuchat, L.R. y Monteville, T.J. Ed. ASM Press, Washington D.C., pp: 125-158.
- Daeschel, M.A (1989). Antimicrobial Substances from Lactic Acid Bacteria for Use as Food Preservatives (1989). *Food Technol.*, 44: 164-167.
- Dainty, R.H y Mckey, B.M.(1992). The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *J. Appl. Bact. Symp. Suppl.* 73: 103S-114S.
- Dainty, R.H., Edwards, R.A. Hibbard, C.M. y Ramantanis, S.V. (1986). Bacterial sources of putrescine and cadaverine in chill stored vacuum-packaged beef. *J. Appl. Bacteriol.* 61: 117-123.
- Davis, 1951. En : En Merck Igoda. 1990. Indicaciones, control de calidad y conservación de medios de cultivo granulados. Cultivos especializados. División de diagnósticos, México.
- Eitenmiller, R.R., Koehler, P.E. y Reagan, J.O. (1978). Tyramine in fermented sausages: factors affecting formation of tyramine and tyrosine decarboxylase *J. Food Sci.* 43:689-693.
- Ellebracht, E.A., Castillo, A., Lucía, L.M., Miller, R.K. y Acuff G.R. (1999). Reduction of pathogens using hot water and lactic acid on beef trimmings. *J. Food. Sci.* 64(6): 1094-1099.
- Fadda, S., Sanz, Y., Vignolo, G., Aristoy, M.C., Oliver, G. y Toldra, F. (1999a). Hydrolysis of pork muscle sarcoplasmic proteins by *Lactobacillus curvatus* y *Lactobacillus sake*. *Appl. Env. Microbiol.* 65(2): 578-584.
- Fadda, S., Sanz, Y., Vignolo, G., Aristoy, M.C., Oliver, G. y Toldra, F. (1999b). Characterization of muscle and miofibrillar protein hydrolysis caused by *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Env. Microbiol.* 65(8): 3540-3546.
- Foegeding, P.M., Thomas A.B., Pilkington D.H. y Klaenhammer T.R. (1992). Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced pediocin during fermented sausages production. *Appl. Env. Microbiol.*, 58(3):884-890.

- 
- Food Drug Administration: Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 1993-1997: <http://www.fda.org.edu>
- Forrest, J.C., Aberle, E.D., Hedrich, H.D., Hudge, M.D. y Merkel, R.A. (1974) Fundamentos de la ciencia de la carne. Ed. Acribia, Zaragoza, España pp: 21-68.
- Franco, C.M., Quinto, J.E., Fente, C., Rodriguez-Otero, J.L., Domínguez, L. y Cepeda, A. (1995). Determination of the Principal Sources of *Listeria spp.* En Poultry Meat and a Poultry Processing Plant. 58(12): 1320-1325.
- García, T.R., Sanz, B. y Hernández, P.E. (1995). Extensión de la vida útil de la carne fresca. I: envasado en atmósferas modificadas y utilización de bacterias lácticas y bacteriocinas. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de alimentos.* 35(1), 1-18.
- Garriga, M., Hugas, M., Aimerich, T y Monfort, J.M. (1993). Bacteriocinogenic activity of lactobacilli from fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.* 75:142-148.
- Gill, C.O. (1986). The Control of microbial spoilage in fresh meats. En *Advances in Meat Research*, Vol. 2, Editores Pearson A.M. y Dutson T.R. Editorial AVI Publishing Co., Inc. Westport, Conn, pp: 49-88.
- Goff, J.H., Bhunia, A.K., Johnson, M. G. (1996). Complete inhibition of *Listeria monocytogenes* on Refrigerated Chicken Meat With Pedicin AcH Bound to Heat-Killed *Pediococcus acidilactici* Cells. *J. Food Prot.* 59(11): 1187-1192.
- Gould, G.W. (2000). Strategies for food preservation. En *The Microbiological Safety and Quality of Food.* Editores Lund B.M., Baird-Parker T.C. y Gould G.W., vol I, Ed. Aspen Publishers, Inc, Gaithersburg, Maryland, pp: 19-31.
- Greer, G. G. (1989). Red Meats, poultry and fish. En *Enzymes of Psychrotrophs in Raw Food.* Editor McKellar R.C., Ed. CRC Press, Boca Raton Florida, USA, pp: 268-292.
- Greer, G.G. y Jones, S.D.M. (1991). Effects of lactic acid and vacuum packaging on beef processed in a research abattoir. *Can. Inst. Sci. Technol. J.* Vol. 24, No. ¾, pp. 161-168.
- Guerrero I., y Arteaga, M.R.(1990). Tecnología de carnes: Elaboración y preservación de productos cárnicos. Ed. Trillas, México. pp:15-30
- Guerrero, I. y Taylor, A.J.(1994). Meat Surface Decontamination using lactic acid from Chemical and Microbial Sources. *Lebnsn. Wiss. U. Technol.* 27: 201-209.

- Guerrero, I., R. Mendiola, Ponce, E. y Prado, A. (1995). Inoculation of acid bacteria on meat surfaces as a means of decontamination in semitropical conditions. *Meat Science*, 40: 397-411.
- Guerrero-Legarreta, I. y Chavez-Gallardo, A.M. (1991). Detection of Biogenic amines as meat spoilage indicators. *J. Muscle Foods*. 2:263-278
- Guidolin, M. L.I., Schuch, B.L., Soriano, L. B., Díaz de Avila, L., Lazzeri J.J.B., Martins, F.L.L., Nascimento, N.T. (1998). Inhibición de microorganismos indeseables en la superficie de las canales de pollo refrigeradas. *Eurocarne*, 67: 61-70
- Haláz, A., Baráth, Á., Simon-Sakadi, L., Holzapfel, W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Sci. and Technol.*, vol. 5: 42-49.
- Hargis, B.M., Caldwell, D.J., y Byrd, J.A. (2001). Microbial pathogens: live poultry considerations. En *Poultry Meat Processing*, Editor Sams A.R., Ed. CRC Press. Boca Raton, Florida. Pp: 121-133
- Hernandez-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M.A., Veciana-Nogués, M.T., Mariné-Font, A. y Vidal-Carou, M. C. (1997). Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products. *J. Agric. Food Chem.*, 45:2098-2102.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath P.H.A., Staley, J.T. y Williams, S.T. (1994). *Determinative Bacteriology*, Novena edición. Ed. Williams and Wilkins, Baltimore, Maeyland, E.U.A., pp: 527-558.
- Hugas, M. (1993). Acción antimicrobiana de las bacterias lácticas: sistemas naturales de conservación de los alimentos. *Eurocarne*, 15: 47-53
- Hugas, M. (1998). Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria for the Biopreservation of Meat and Meat Products. Memorias del 44<sup>th</sup> ICoMST, Barcelona, España.
- Hugas, M., Aymerich, M.T. y Monfort, J.M. (1995). Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC4494. *J. Appl. Bacteriol.*, 79: 322-330.
- Hultin, H.O. (1993). Características del tejido muscular. En *Química de los alimentos*. Editor Fennema O. Ed. Acribia, España. pp: 815-888.
- Hwang, D.F., Chang S. H., Shiau, A.Y. y Cheng, A.C. (1995). Biogenic amines in the flesh of sailfish (*Istiophorus platypterus*) responsible for scombroid poisoning. *J. Food Sci.* 60(5): 926-928).

- Ibarra Silva, J.L.N. (1999). Influencia de las condiciones de crecimiento en la producción de la bacteriocina generada por *Lactobacillus plantarum* BAL-1, aislada de Kefir. Tesis de Maestría, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, México.
- INEGI (1998). Anuario Estadístico, México.
- Izquierdo-Pullido, M.A., Font Fábregas, J., Carceller-Rosa, J.M., Mariné-Font, A. y Vidal-Carou, C. (1996). Biogenic amine changes related to lactic acid bacteria during brewing. *J. Food Prot.* 59(2):175-180.
- Jackson, T.C., Acuff, G.R. y Dickson J.S. (1997). Meat, Poultry and Seafood. En *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Editores Doyle, M.P., Beuchat, L.R. y Montville, T.J., Ed. ASM Press, Washington D.C., E.U.A., pp: 13-79.
- Jay, J. (1994). Microbiología moderna de los alimentos. Ed. Acribia, España, pp.45-621
- Jay, J. (1996). *Modern Food Microbiology*. Chapman & Hall. E.U.A. pp:69-103.
- Joosten, H.M.L.J. y Nuñez, M. (1996). Prevention of histamine formation in cheese by bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(4):1178-1181.
- Kakouryi, A. y Nychas, G.J.E. (1994). Storage of poultry meat under modified atmospheres or vacuum packs: possible role of microbial metabolites as indicator of spoilage. *J. appl. Bacteriol.* 75:163-172.
- King, E. O., Ward, M.K., y Raney, D.E., (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.*, 44:301-307. En Merck Igoda. 1990. Indicaciones, control de calidad y conservación de medios de cultivo granulados. Cultivos especializados. División de diagnósticos, México.
- Klaenhammer, T.R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70:337-349
- Klettner, P.G.(1995) Meat and meat products: Measuring texture and consistency with testing machines. *Fleischwirtsch International.* (2): 36-39.
- Kotula, K. y Pandya, Y.(1995) Bacterial Contamination of Broiler Chickens before Scalding. *J. Food Prot.* 58(12):1326-1329.
- Koutsoumanis, K., Lampropoulou, K. y Nychas, G.J. (1999). Biogenic amines and sensory changes associated with the microbial flora of Mediterranean gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) stored aerobically at 0,8, and 15 degrees. *J. Food Prot.* 62(4): 398-402.

- Kuri, V. (1998). Regardless of the retail conditions lactic acid bacteria and *Salmonella* from Mexican pork products characterization and antagonism. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy. Queen's University of Belfast. Fac. of Agriculture.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lawrie, R.A. 1985. Meat science. Pergamon Press Ltd. Headington Hill Hall, London, pp 21-31.
- Lea, C.H., Stevens, B.J.H. y Smith, M.J. (1969). Chemical and Organoleptic Changes in Poultry Meat Resulting from the Growth of Psychrophilic Spoilage bacteria at 1°C. *Br. Poult. Sci.*, 10: 103-217.
- Leistner, L. y Gorris, L.G.M. (1995). Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Sci. and Technol.* 6 : 41-46.
- Liu, M.N., Foegeding, E.A., Wang, S, Smith, D.M. y Davidian, M. (1996). Denaturation and aggregation of chicken myosin isoforms. *J. Agric. Food Chem.* 44:1435-1440
- Lloyd, A.G. y Drake, J.J. (1975). Problems by essential food preservatives. *Br. Med. Bull.* 31, 214-219.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Lücke F. (2000). Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Sci.*, 56(2000):105-115.
- Lund B.M. y Eklund T. (2000). Control of pH and use of Organic Acids. En *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Vol. 1. Editores Lund B.M., Baird-Parker T.C. y Gould G.W. Ed. Aspen Publishers, Inc, Gaithersburg, Maryland., pp: 175-193.
- Mahadeo, M. y Tatini, S.R. (1994). The potential use of nisin to control *Listeria monocytogenes* in poultry. *Lett. Appl. Microbiol.*, 18: 323-326.
- Maijala, R., Eerola, S., Lievonen, S., Hill P., y Hirvi, T. (1995). Formation of biogenic amines during Ripening of dry sausages as affected by starter culture and thawing time of raw materials. *J. Food Sci.* 60(6): 1187-1190.
- Maijala, R. (1994). Histamine and tyramine production by *Lactobacillus* strain subjected to external pH decrease. *J. Food Prot.* 57 (3): 259-262.

- 
- Maijala, R.L. (1993). Formation of histamine and tyramine by some lactic acid bacteria in MRS-broth and modified decarboxylation agar. *Lett Appl. Microbiol.* 17(40-43).
- Manzanares, A. (1997). Bacterias beneficiosas al hombre. *La alimentación Latinoamericana*, 218: 59-65.
- Martínez, M.M.I., Martínez, C.J.M., Herranz, S.C., Suárez, G.A.M. Rodríguez, Gómez J.M. (2000). Las bacteriocinas de las bacterias lácticas. 2. Modo de acción, biosíntesis, aplicaciones y tendencias futuras. *Alimentaria*: Julio-agosto 00/59, pp.67-73.
- Maurer, A.J. (1993). Poultry, En *Encyclopedia of Food Science Food Technology and Nutrition*. Editada por R. Macrae, R.K. Robinson y M.J. Sadler. Academic Press, Londres. pp: 3686-3692.
- McMeekin, T.A. (1975). Spoilage Association of Chicken Breast Muscle. *Appl. Microbiol.* 29(1): 44-47.
- McMeekin, T.A. (1977). Spoilage Association of Chicken Leg Muscle. *App. Environ. Microbiol.* 33(6):1244-1246.
- McMullen, L.M. y Stiles, M.E. (1996). Potential Use of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria in Preservation of Meats. *J. Food Prot. Suppl.* 64-71.
- Minor, P.H. (1988). Cambios en parámetros fisicoquímicos relacionados con la calidad de la carne de cerdo sometida a fermentación láctica como método de conservación. Tesis Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, México, D.F.
- Molin, G. (2000). Modified Atmospheres. En *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Editores Lund B.M., Baird-Parker T.C. y Gould G.W., vol I, pp: 3-18. Ed. Aspen Publishers, Inc, Gaithersburg, Maryland, pp: 214-229.
- Montville, T.J. (1997) Principles which influence microbial growth, survival and death in foods. En *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Editores Doyle, M.P., Beuchat, L.R. y Montville, T.J., Ed. ASM Press, Washington D.C., E.U. pp: 13-79.
- Montville, T.J. y Winkowski, K. (1997). Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. En *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Editores Doyle, M.P., Beuchat, L.R. y Montville, T.J., Ed. ASM Press, Washington D.C., E.U.A. pp: 557-570
- Mulder, R.W.A, Dorresteyn, W.J. y Van der Broeck (1978). Cross-Contamination During The Scalding and Plucking of Broilers. *Br. Poult. Sci.* 19: 61-70.

- Murphy, R.Y. y Marks, B.P. (2000). Effect of meat temperature on protein, texture, and cook loss for ground chicken breast patties. *J. Poultry Sci.*, 79: 99-104.
- Nes, F., Diep, D.B., Haverstein, L.S., Brurbers., Eijenk, M.B., y Vand Holo, H. (1996) Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70:113-128.
- Netten, P.V., Huis, in 't Veld J.H.J y Mossel, D.A.A. (1994).The immediate bactericidal effect of lactic acid on meat-borne pathogens. *Lett. App. Bacteriol*. 77: 490-496.
- Nielsen, J.W., Dickson J.S. y Crouse J.D. (1990). Use of bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. *App. Env. Microbiol.*, 56 (7): 2142-2145.
- Ogden, S.K., Guerrero, I., Taylor, A.J., Escalona Buendía, H. y Gallardo, F. (1995). Changes in Odour, Colour and Texture during in Storage of Acid Preserved Meat. *Lebensm Wiss. U. Technol*. 28:521-527.
- Ohlsson, T. (1994). Minimal processing – preservation methods of the future: an overview . *Trends in Food Sci. and Technol*. 5 : 341-344.
- Pearson, A.M. y Young, R.B. (1989). *Muscle and Meat Biochemistry* . Academic Press, Inc, U. S.A.
- Pérez Chabela, Ma. L.,(1998). Efecto de las calpaínas sobre las propiedades fisicoquímicas, ultraestructurales y sensoriales de la carne roja. Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa, México.
- Pérez-Alvarez, J.A., Fernández López J., y Sayas, Barberá E., (2000). Fundamentos fisico-químicos, ultrasensoriales y tecnológicos en el color de la carne. En *Nuevas tendencias en la tecnología e higiene de la industria cárnica*”. Editores Rosmini M.R., J.A. Pérez Alvarez y Fernández López J. Universidad Miguel Hernández España y Universidad Nacional del Litoral, Argentina, pp 11-39
- Ponce, Alquicira E., Pérez Chabela, M.L. y Guerrero, Legarreta I. ( 2000). Propiedades funcionales de la carne. En *Nuevas tendencias en la tecnología e higiene de la industria cárnica*. Editores M.R. Rosmini, J.A Pérez Alvarez y J. Fernández López. Universidad Miguel Hernández, España y Universidad del Litoral, Argentina, pp: 41-50.
- Prescott, L.M., Harley, J.P y Klein, D.A. (1999). *Microbiología*. Cuarta edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana., España, pp: 493-496.
- Price, J.F. y Schweert, B.S. (1981). *The science of meat and meat products*. W.H. Freeman and Company . San Francisco, E.U.A., pp:11-77.

- Ramírez, J., Guerrero, I., Ponce, E. y Prado A. (1995). Changes in flavor attributes during ripening of fermented sausages. *J. Muscle food*, 6:257-269.
- Requena, T. y Pelaéz, C. (1995). Producción de bacteriocinas. *Rev. Esp. Tecnol. Aliment.* 35(1):19-43.
- Ricke, S. C. y Keeton, J.T. (1997). Fermented meat, poultry and fish products. En *Food Microbiology: Fundaments and Frontiers*. Editores Doyle, M.P., Beuchat, L.R. y Montville, T.J., Ed. ASM Press, Washington D.C., E.U.A. pp: 610-628.
- Rocourt, J. y Cossart P. (1997) *Listeria monocytogenes*. En *Food Microbiology: Fundaments and Frontiers*. Editores Doyle, M.P., Beuchat, L.R. y Montville, T.J., Ed. ASM Press, Washington D.C., E.U. pp: 337-351.
- Rodríguez, E., Gaya P., Nuñez, M. y Medina M. (1998). Inhibitory activity of a nisin-producing starter culture on *Listeria innocua* in raw ewes milk Manchego cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 39:129-132.
- Roig-Sagués, A. y Erola, S.(1997). Biogenic amines in meat inoculated with *Lactobacillus sake* starter strain and an amina-positive acetic acid bacterium. *Lebnsnsm Unters Frosch*, A. 228-231.
- Roig-Sagués, A. X., Hernández-Herrero, M. Rodríguez-Jeréz, J.J., López-Sabater, L.I. y Mora-Ventura, M.T. (1997). Histidine decarboxylase activity of *Enterobacter cloacae* S15/19 during the production of ripened sausages and its influence on the formation of cadaverine. *J. Food. Prot.* 60(4):430-432.
- Ronald M. Atlas. (1993). *Hand Book of Microbiological*. Ed. Lawience C. Parks, Londres.
- Russell, M. S. (2001). Spoilage bacterial associated with poultry. En *Poultry Meat Processing*, Editor Sams A.R., Ed. CRC Press. Boca Raton, Florida.pp: 160-171.
- SAGAR, Centro de Estadística Agropecuaria, México.
- Samejima, K. y Wolfe, F.H. (1976) Degradation of myofibrillar protein components during postmortem aging of chicken muscle. *J. Food. Sci.*, 41:250-254.
- Santos-Buelga, C., Peña-Egido, M.J y Rivas-Gonzalo, J.C. (1986). Changes in tyramine during chorizo-sausage ripening . *J. Food Sci.* 51(2): 518-530.
- Silla, M. H. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 29: 213-231

- Smith, D.M. (2001). Functional properties of muscle proteins in proteins poultry products. En Poultry Meat Processing. Editor Sams A. Ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, E.U.A. pp: 181-194.
- Smulders, F.J.M., Barendsen, P., Logtestijn, J.G., Mossel, A.A. y Marel, G.M.. (1986). Review: Lactic acid : considerations in favour of its acceptance as meat decontaminate. *J. Food Technol.*, 21:419-436.
- Stainer, R. Y., Palleroni, N.J. y Doudoroff, M. (1966). The aerobic Pseudomonas –a taxonomic study- *J. Gen. Microbiol.*, 42:159-271. En Merck Igoda. 1990. Indicaciones, control de calidad y conservación de medios de cultivo granulados. Cultivos especializados. División de diagnósticos, México.
- Stiles, E. M. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70, 331-345.
- Tramer, J. y Fowler, G.G. (1964). Estimation of nisin in foods. *J. Sci. Food Agric.* 5:522-528.
- Treviño, E., Beil, D. y Steinhart, H. (1997). Formation of biogenic amines during the maturity process of raw meat products, for example cervelat sausage. *Food Chem.* 60 (4) 521-526.
- Trout, G.R. (1989). Techniques for measuring water binding capacity in muscle foods. A review of methodology. *Meat Sci.*, 23: 235-252.
- Vandenbergh, P.A. (1993). Lactic acid bacteria , their metabolic products and interference with microbial grow. *FEMS Microbiology Reviews* 12: 221-238.
- Vega, L., Bruce, J., Crawford, S. y Humpherson, L. (1998). The use of organic acids as potential inhibitors of bacterial grow in minced beef. Memorias del 44<sup>th</sup> Annual International Congress of Meat Science and Technology , Barcelona, Spain. Proceeding Vol. I.
- Voissey P.W. (1976). Instrumental measurement for food texture. En Rheology and Texture in food quality. J.M. de Man, P.W. Voisey, V.F., V.F. Rasper, y D.W. Stanley . Editores Avi Publishing Co. Westport, Connecticut. pp 79-141.
- Wheeler, T.L., Koohmaraie, M., Lansdell, J.L., Siragusa, G.R. y Miller, M.F. (1993). Effects of postmortem injection time, injection level , and concentration of calcium chloride on beef quality tains . *J. Animal Sci.*, 71:2965-2974.
- Young, O.A., Barker, G.J. y Frost , D.A. (1996). Determination of collagen solubility and concentration in meat by near infrared spectroscopy. *J. Muscle Food.*, 7:377-387.

- 
- Zamora, M.B. y Zaritzky N.E. (1985). Modeling of microbial growth in refrigerated packaged beef. *J. Food Sci.*, 50:1003-1013.
- Zeitoun, A.A.M., Debevere, J.M., y Mossel, .D.A.A. (1994). Significance of Enterobacteriaceae as index organisms for hygiene on fresh untreated poultry, poultry treated with lactic acid and poultry stored in modified atmosphere. *Food Microbiol.*, 11: 169-176

---

## **9. ANEXOS**

---

---

## ANEXO 1

### MEDIOS DE CULTIVO

#### a) Medio GSP, selectivo para el crecimiento de *Pseudomonas* (Stainer y col., 1966).

**Tabla A1** Componentes del Medio GSP, selectivo para el crecimiento de *Pseudomonas*

Ingrediente	Cantidad g/L
Glutamato monosódico	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2
Sulfato de magnesio	0.5
Agar	15
Penicilina G sódica	100 000 U.I.

#### Principio

Como base nutritiva se utiliza el glutamato, que no puede ser aprovechado por otros microorganismos acompañantes. Para aumentar la selectividad se agrega penicilina al medio de cultivo la cual inhibe a los microorganismos Gram-positivos por daños en la membrana celular (Stainer y col., 1966).

#### Modo de preparación

En agua destilada se disuelven todos los ingredientes de la tabla excepto el agar. Posteriormente, se afora a 1000 mL y el pH se ajusta a  $7 \pm 0.2$  y se adiciona el agar y la mezcla se lleva a ebullición. A continuación el medio se esteriliza a 121°C por 15 minutos. Una vez esterilizado el medio, se deja enfriar el medio y se adicionan 100,000 U.I. de penicilina G sódica para inhibir el crecimiento de microorganismos Gram-negativo

**b) Medio F, para el crecimiento y propagación de *Pseudomonas* (King y col, 1954)**

**Tabla A2** Componentes del medio F para el crecimiento selectivo y propagación de *Pseudomonas*

Ingrediente	Cantidad
Peptona de caseína	10 g/L
Peptona de carne	10 g/L
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	1.5 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5 g/L
Glicerol	10 mL
Agua destilada	1000 mL
pH	7±0.2

**c) Agar Bilis rojo neutro-cristal violeta (BRV) para la demostración y numeración de coliformes totales (Davis, 1951)**

**Tabla A3** Medio agar bilis y rojo violeta para la demostración y numeración de bacterias coliformes

Ingredientes	g/L
Peptona de carne	7.0
Extracto de levadura	3.0
Cloruro de sodio	5.0
Lactosa	10.0
Rojo neutro	0.03
Mezcla de sales biliares	1.5
Cristal violeta	0.002
Agar-Agar	13.0
pH	7.4±0.2

### Principio

El cristal violeta y las sales biliares inhiben el crecimiento sobre todo, de la flora Gram-positiva acompañante. La degradación de la lactosa a ácido se pone de manifiesto por el viraje a rojo del indicador de pH Rojo neutro y por una precipitación de ácidos biliares.

#### d) Caldo LB, Medio de cultivo para el crecimiento y propagación de *E. coli*

(Atlas Ronald , 1993).

**Tabla A4** Caldo LB para el crecimiento y propagación de *E.coli*

Ingredientes	Cantidad (g/L)
Extracto de levadura	15
Triptona	10
Cloruro de sodio	5
Agar-Agar	15
Hidróxido de sodio 1N	1
pH final	7.0±0.2

#### e) Medio CGB para la producción de bacteriocinas (Bhunia y col. , 1988)

**Tabla A5** Medio CGB para la producción de bacteriocinas

Ingrediente	Cantidad g/L
Triptona	20
Glucosa	10
Extracto de levadura	5
Citrato de amonio	2
Difosfato de sodio	2
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de Manganeso	0.015
Tween 80	1 mL
Agar	15
pH	7±0.2

---

---

## ANEXO 2

### TÉCNICAS EMPLEADAS

#### a) Capacidad de retención de agua (Price y Schweigert (1981))

- Moler 10 g de carne en un mortero.
- Colocar porciones de 5g en dos tubos de centrifuga.
- Añadir 8 mL de una solución de NaCl 0.6 M
- Agitar empleando una varilla de vidrio durante 1 minuto.
- Colocar la mezcla formada en un baño de hielo durante 30 minutos
- Agitar las muestras nuevamente durante 1 minuto.
- Centrifugar a 8000 r.p.m. a 4°C durante 15 minutos
- Decantar y medir el sobrenadante
- Reportar la capacidad de retención de agua (CRA) como el volumen de NaCl 0.6 M retenido por 100 g de carne.

#### b) Extracción de las proteínas miofibrilares (Samejima. y Wolfe, 1976)

La extracción de las proteínas miofibrilares se realiza con base en la solubilidad de las proteínas mediante una precipitación fraccionada para ello, en primer término, se deben preparar las siguientes soluciones:

**Tabla A6.** Soluciones empleadas para la extracción de proteínas miofibrilares

Solución A			Solución B			Solución C		
		g/L			g/L			g/L
NaCl	0.1M	5.841	NaCl	0.6M	35.0	NaCl	0.6	35
MgCl	2mM	0.18	MgCl <sub>2</sub>	5mM	0.476	Buffer de fosfatos pH 6, 50mM		
EDTA	1mM	0.3722	Na <sub>2</sub> P <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	5M;	2.23	Azida de sodio		
Dithiothreitol	0.5mM	0.0771	Buffer de fosfatos pH 6, 50mM					
Buffer de fosfatos pH 7,	10mM							

### Método

- Pesar 10 g de carne
- Homogenizar con 100 mL de la solución A
- Centrifugar ( 9000 rpm durante 25 minutos a 4°C) y descartar el sobrenadante “a”
- Resuspender el precipitado “a” en 100mL de solución A
- Centrifugar ( 9000 rpm durante 25 min. ,4°C) decantar el sobrenadante “b”.
- Resuspender el precipitado “B en 60mL de solución B.
- Agitar a baja velocidad y mantener a 4°C durante toda la noche.
- Centrifugar a 9000 rpm, 25 min. a 4°C.
- Decantar el precipitado “c”.
- Decantar con cuidado el sobrenadante “c” y diluirlo hasta una fuerza iónica de 0.1 con agua desionizada enfriada a 4°C (600 mL) dejar reposar toda la noche en refrigeración.
- Resuspender el precipitado “d” en 5mL de la solución C
- Dializar en la solución “C”.
- Centrifugar (9000 rpm, 15 min, 4°C) y coleccionar el sobrenadante.
- Determinar contenido de proteína

**c) Extracción de aminas biogénicas (Hwang y col., 1995)****1. Preparación de los estándares****Tabla A7** Estándares empleados para el análisis de aminas biogénicas en músculo de pollo

Amina	mg
Triptamina hidrociorada	12.8
Putrescina hidrociorada	18.29
Cadaverina hidrociorada	17.14
Trimetilamina hidrociorada	12.67

Preparación de la solución estándar de aminas

Disolver cada estándar en 1mL de agua desionizada. La concentración final de cada amina libre es 10mg/mL.

**Derivatización**

1. Se tomaron 50  $\mu$ L de cada estándar o 2mL de muestra
2. Se adicionó 1mL de NaOH 2M
3. Se adicionaron 10  $\mu$ L de cloruro de benzoilo (E. Merck, Darmstadt, Germany)
4. La mezcla anterior se mezcló en un vortex y se dejó reposar 20 min.
5. Para la derivatización, se adicionaron 2mL de una solución saturada de NaCl 5M.
6. Se extrajo la amida con 3mL de dietil eter agitando suavemente
7. Se transfirió la fase orgánica en un tubo
8. Se evaporó a sequedad en el rotavapor
9. Se disolvió el residuo en 500  $\mu$ L de una mezcla de metanol- agua 50:50
10. Se analizaron alícuotas de 50  $\mu$ L en el HPLC.

## 2. Preparación de las muestras

1. Se homogeneizaron 5g de muestra con 20 mL de ácido tricloroacético al 6% durante 3 min.
2. Posteriormente, esta mezcla se centrifugo a 8000g, por 10 minutos y a 4°C.
3. Se filtro el sobrenadante a través de un papel Watman No. 2.
4. El filtrado se transfirió a un matraz y se aforó a 25mL.
5. Finalmente, 2 mL de este extracto fueron derivatizados mediante el procedimiento señalado anteriormente.

## 3. Principio

La reacción entre las aminas y en presencia de un cloruro de ácido es conocida como "Reacción de Schotten-Baumann" (que en este caso es el cloruro de benzoílo) en presencia de una solución de NaOH da como resultado la formación de una amida."

### d) Gradientes de metanol empleados para el análisis de aminas biogénicas

**Tabla A8** Gradientes de metanol empleados en la elusión de muestras analizadas por HPLC

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	%A (% Metanol)	%B (Metanol al 55%)	Curva
0	0.5	0	100	
8	0.5	0	100	11
10	0.5	50	44	6
20	0.5	56	44	11
21	0.5	100	0	6
25	0.5	100	0	11
27	0.5	0	100	6
28	0.5	0	100	11

## ANEXO 3

### CURVAS PATRÓN Y CROMATOGRAMAS

#### a) Curvas Patrón para ácidos orgánicos de cadena corta

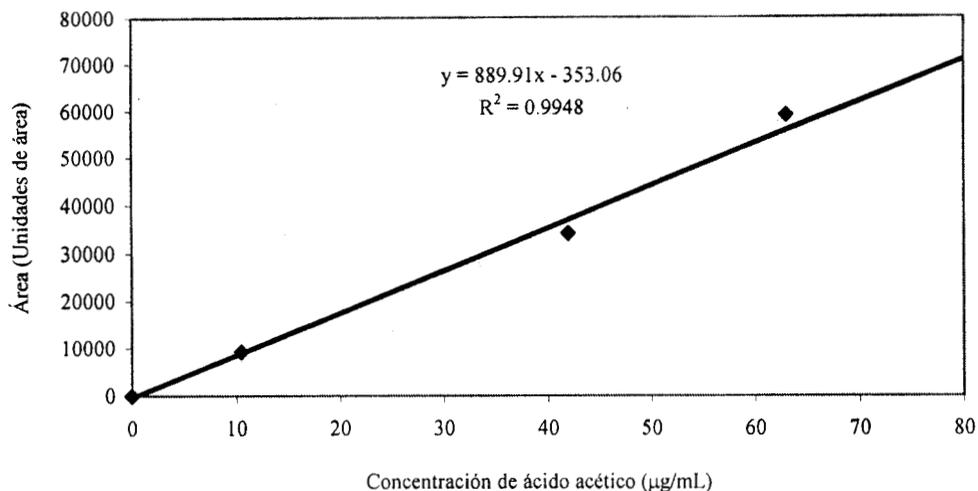


Figura A1. Curva patrón de ácido acético

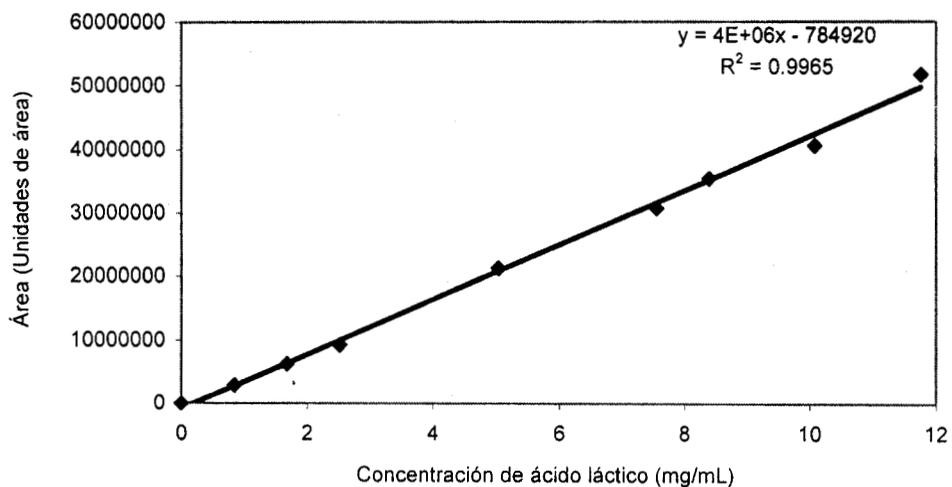
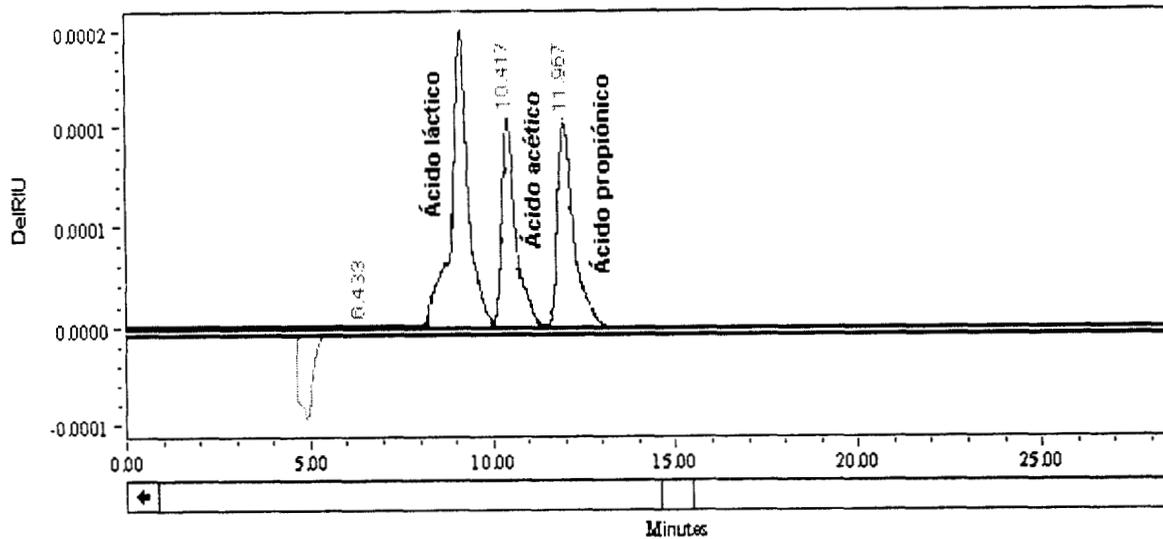


Figura A2. Curva patrón de ácido láctico

**b) Cromatogramas para ácidos orgánicos**

**Figura A3** Cromatograma de la separación de ácidos orgánicos de cadena corta mediante intercambio catiónico, en una columna -SH 1011 de con dimensiones 8 x 300 mm; volumen inyectado 100  $\mu$ L, flujo 1 mL/min y eluyente  $H_2SO_4$ .

## c) Curvas Patrón de Aminas Biogénicas

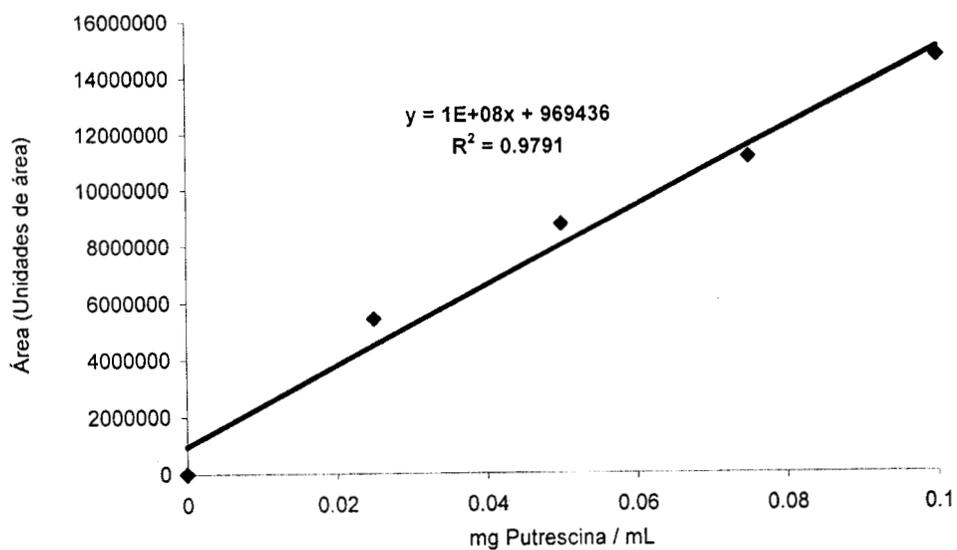


Figura A4. Curva patrón para putrescina

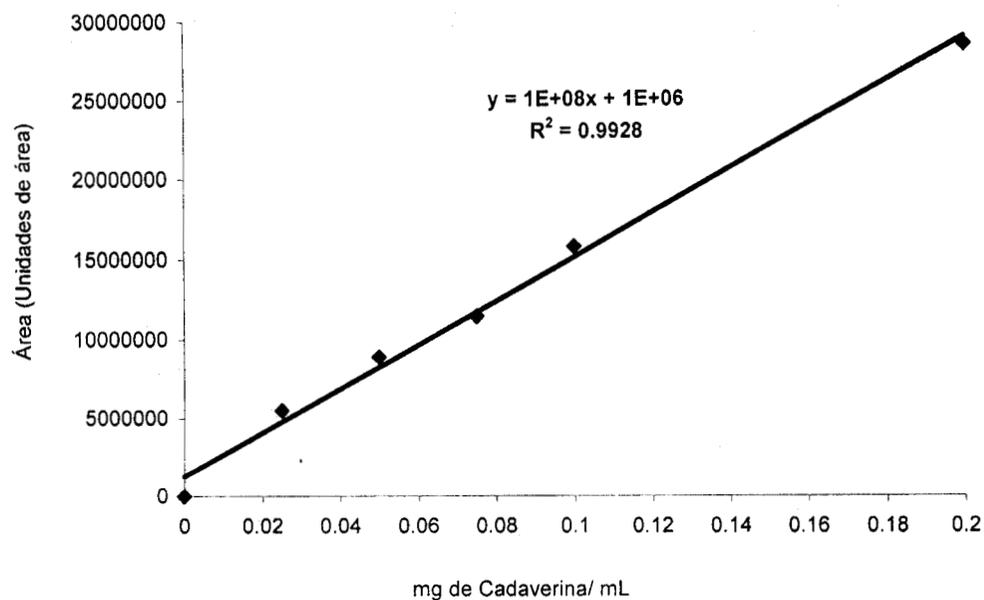
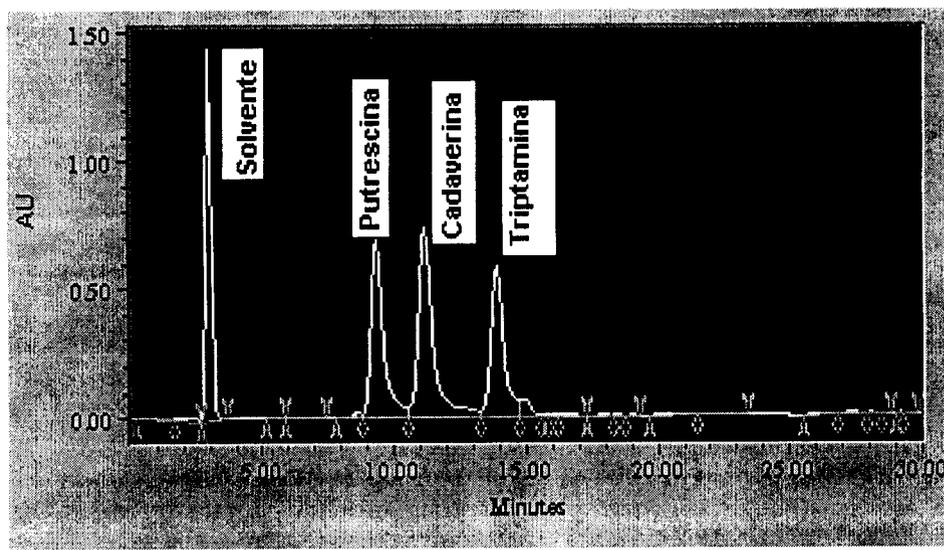


Figura A5. Curva patrón para cadaverina

## d) Cromatograma para aminas biogénicas



**Figura A6.** Cromatograma a 254 nm de la separación de aminas biogénicas mediante intercambio catalítico, en una columna de fase reversa Simmetry C-18 con una longitud de 3.9 x 150 mm y un tamaño de poro de 91Å, con una longitud de 3.9 x 150 mm; volumen inyectado 50 µL, flujo 0.5 mL/min, en un gradiente exponencial de metanol del 55-100%.

## ANEXO 4 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

### a) Selección de la fuente de carbono

**Tabla A9.** Análisis de varianza para la selección de la fuente y concentración de carbono

Variable Respuesta	Fuente de variación (P>)		
	Fuente de carbono	Concentración de la fuente de carbono	Inóculo
ATT	0.0001*	0.0001*	0.0001*
pH	0.0001*	0.0001*	0.0001*

\*Significativo al 5%

**Tabla A10.** Comparación de medias por método de Duncan para la selección del inóculo y fuente de carbono

Fuente de variación	Niveles	pH	ATT
Inóculo	Testigo	5.53 <sup>a</sup>	1.87 <sup>c</sup>
	<i>L. lactis</i>	5.367 <sup>b</sup>	2.04 <sup>b</sup>
	<i>S. carnosus</i>	5.362 <sup>b</sup>	1.93 <sup>a</sup>
Fuente de carbono	Sin fuente de carbono	5.97 <sup>a</sup>	1.77 <sup>b</sup>
	Glucosa	5.42 <sup>b</sup>	1.93 <sup>a</sup>
	Sacarosa	5.41 <sup>b</sup>	1.97 <sup>a</sup>
Concentración de sacarosa	0.0%	5.86 <sup>a</sup>	2.14 <sup>a</sup>
	2.5%	5.67 <sup>b</sup>	2.04 <sup>b</sup>
	5%	5.30 <sup>c</sup>	1.99 <sup>c</sup>
	7.5%	5.19 <sup>d</sup>	1.83 <sup>d</sup>
	10%	5.10 <sup>e</sup>	1.73 <sup>e</sup>

\*Para cada grupo, medias con superíndices con la misma letra no son significativamente diferentes

**b) Efecto de la fermentación láctica del músculo de pollo sobre los parámetros fisicoquímicos del músculo blanco de pollo.**

**Tabla A11.** Análisis de varianza para la variación promedio del pH, ATT y CRA, del músculo de pollo tratado con bacterias lácticas o nisina y 5% de sacarosa, almacenado a  $10 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 8 días

Variable Respuesta	Fuente de variación P(>)	
	Inóculo	Tiempo
ATT	0.0010	0.0001
pH	0.0001	0.0001
CRA	0.0001	0.0001

\*Significativo al 5%

**Tabla A12.** Prueba múltiple de Duncan para la variación promedio del pH, acidez total titulable (ATT) y capacidad de retención de agua (CRA) en el músculo de pollo tratado con bacterias lácticas o nisina en presencia de 5% de sacarosa, almacenado a  $10 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 8 días

Inóculo	pH	ATT	CRA
Testigo	5.52 <sup>c</sup>	1.68 <sup>a</sup>	15.25 <sup>c</sup>
Nisina	5.59 <sup>d</sup>	1.70 <sup>a</sup>	18.25 <sup>c</sup>
<i>S. carnosus</i>	5.29 <sup>b</sup>	1.85 <sup>b</sup>	10.50 <sup>b</sup>
<i>L. lactis</i>	5.04 <sup>a</sup>	2.00 <sup>c</sup>	5.75 <sup>a</sup>

\*Para cada grupo, medias seguidas por superíndices con la misma letra no son significativamente diferente

**Tabla A13.** Análisis de varianza para la variación promedio del pH, ATT y CRA, del músculo de pollo tratado con bacterias lácticas o nisina y 2.5% de sacarosa, almacenado a  $10 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 8 días.

Variable Respuesta	Fuente de variación P(>)	
	Inóculo	Tiempo
ATT	0.0000	0.0001
PH	0.0001	0.0001
CRA	0.0001	0.0001

\*Significativo al 5%

**Tabla A14.** Prueba múltiple de Duncan para los parámetros fisicoquímicos pH, acidez total titulable (ATT) y capacidad de retención de agua (CRA) en el músculo de pollo inoculado con bacterias lácticas o nisina y 2.5% de sacarosa, almacenado a  $10 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 8 días

Tratamiento	pH	ATT	CRA
Testigo	5.67 <sup>c</sup>	1.50 <sup>a</sup>	19.25 <sup>b</sup>
Nisina	5.76 <sup>d</sup>	1.54 <sup>a</sup>	23.500 <sup>b</sup>
<i>S. carnosus</i>	5.55 <sup>b</sup>	1.66 <sup>b</sup>	14.25 <sup>a</sup>
<i>L. lactis</i>	5.34 <sup>a</sup>	1.68 <sup>b</sup>	13.50 <sup>a</sup>

\*Para cada grupo o variable, medias seguidas por superíndices de la misma letra no son significativamente diferentes

\*Para cada grupo o variable, medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes

Tratamiento	Luminosidad (L)	Tonalidad (Hue)	Cromaticidad (Chroma)	Cambio de color (ΔE)
Testigo	50.20 <sup>c</sup>	70.30 <sup>b</sup>	27.74 <sup>a</sup>	2.85 <sup>a</sup>
Nisina	49.27 <sup>a</sup>	71.23 <sup>c</sup>	30.44 <sup>b</sup>	3.11 <sup>b</sup>
<i>S. carnosus</i>	52.61 <sup>d</sup>	70.00 <sup>b</sup>	31.69 <sup>c</sup>	3.63 <sup>d</sup>
<i>L. lactis</i>	49.55 <sup>b</sup>	67.97 <sup>a</sup>	30.46 <sup>b</sup>	3.24 <sup>c</sup>

**Tabla A16.** Prueba múltiple de Duncan para la variación promedio de los parámetros de color en el músculo de pollo tratado con bacterias lácticas o nisina y 5% de sacarosa almacenado a 10°C

Variable	Respuesta	Inoculo	Tiempo
Luminosidad (L)	0.0000	0.0001	0.0001
Tonalidad	0.0001	0.0040	0.0001
Cromaticidad	0.0001	0.0001	0.0001
ΔE	0.0001	0.0001	0.0001

\*Significativo al 5%

**Tabla A15.** Análisis de varianza de los parámetros de color del músculo de pollo inoculado con bacterias lácticas o nisina y 5% de sacarosa almacenado a 10°C

**c) Análisis de varianza para el efecto de la fermentación láctica sobre el color**

**Tabla A16.** Análisis de varianza de los parámetros de color del músculo de pollo inoculado con bacterias lácticas o nisina y 2.5% de sacarosa almacenado a 10°C.

Variable Respuesta	Fuente de variación P(>)	
	Inóculo	Tiempo
Luminosidad (L)	0.0000	0.0001
Tonalidad	0.0001	0.0040
Cromaticidad	0.0001	0.0050
$\Delta E$	0.0001	0.0001

\*Significativo al 5%

**Tabla A17.** Prueba múltiple de Duncan para la variación de los parámetros de color en el músculo de pollo tratado con bacterias lácticas o nisina y 2.5% de sacarosa almacenado a 10°C.

Tratamiento	Luminosidad (L)	Tonalidad (Hue)	Cromaticidad (Chroma)	Cambio de color ( $\Delta E$ )
Testigo	53.29 <sup>b</sup>	3.38 <sup>b</sup>	70.6064 <sup>b</sup>	3.38 <sup>c</sup>
Nisina	53.66 <sup>b</sup>	3.43 <sup>b</sup>	70.7043 <sup>b</sup>	3.43 <sup>c</sup>
<i>S. carnosus</i>	53.22 <sup>b</sup>	3.59 <sup>c</sup>	70.3689 <sup>b</sup>	3.59 <sup>b</sup>
<i>L. lactis</i>	51.65 <sup>a</sup>	3.23 <sup>a</sup>	69.2517 <sup>a</sup>	3.23 <sup>a</sup>

\*Para cada grupo o variable, medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes

### d) Análisis de color después de 8 días de almacenamiento

**Tabla A18.** Análisis de varianza de los parámetros de color del músculo de pollo inoculado con bacterias lácticas o nisina y 5% de sacarosa almacenado a 10°C, después de 8 días de almacenamiento

	Fuente de variación P(>)
<b>Variable Respuesta</b>	Inóculo
Luminosidad (L)	0.0001
Tonalidad	0.0001
Cromaticidad	0.0001
$\Delta E$	0.0001

\*Significativo al 5%

**Tabla A19.** Análisis de medias por método de Duncan para la variación del color del músculo de pollo tratado con bacterias lácticas o nisina y 5% de sacarosa, almacenado a 10°C después de 8 días de almacenamiento.

Tratamiento	Luminosidad (L)	Tonalidad (Hue)	Cromaticidad (Chroma)	Cambio de color ( $\Delta E$ )
Testigo	54.02 <sup>c</sup>	71.52 <sup>b</sup>	27.05 <sup>a</sup>	4.71 <sup>b</sup>
Nisina	50.91 <sup>b</sup>	72.55 <sup>b</sup>	28.35 <sup>b</sup>	4.52 <sup>a</sup>
<i>S. carnosus</i>	56.70 <sup>d</sup>	72.06 <sup>b</sup>	30.54 <sup>c</sup>	5.72 <sup>c</sup>
<i>L. lactis</i>	48.25 <sup>a</sup>	64.81 <sup>a</sup>	33.35 <sup>d</sup>	4.78 <sup>b</sup>

\*Para cada grupo o variable, medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferente

**Tabla A20.** Análisis de varianza de los parámetros de color del músculo de pollo inoculado con bacterias lácticas o nisina y 2.5% de sacarosa almacenado a 10°C, después de 8 días de almacenamiento

Variable Respuesta	Fuente de variación P(>)
	Inóculo
Luminosidad (L)	0.0420
Tonalidad	0.0001
Cromaticidad	0.0001
$\Delta E$	0.0220

\*Significativo al 5%

**Tabla A21.** Análisis de medias por método de Duncan para la variación del color del músculo de pollo tratado con bacterias lácticas o nisina y 2.5% de sacarosa, almacenado a 10°C después de 8 días de almacenamiento.

Inóculo	Luminosidad (L)	Tonalidad (Hue)	Cromaticidad (Chroma)	Cambio de color ( $\Delta E$ )
Testigo	57.53 <sup>b</sup>	71.52 <sup>b</sup>	28.04 <sup>a</sup>	5.20 <sup>a</sup>
Nisina	57.53 <sup>b</sup>	71.48 <sup>b</sup>	27.91 <sup>a</sup>	5.18 <sup>a</sup>
S. carnosus	56.27 <sup>a, b</sup>	71.75 <sup>b</sup>	32.16 <sup>c</sup>	5.23 <sup>a</sup>
L. lactis	54.64 <sup>a</sup>	69.87 <sup>a</sup>	30.17 <sup>b</sup>	5.55 <sup>b</sup>

\*Para cada grupo o variable, medias seguidas por superíndices con la misma letra son significativamente iguales

### e) Análisis de varianza para la Textura

**Tabla A22.** Análisis de varianza para la textura del músculo de pollo inoculado con bacterias lácticas o nisina y 5% de sacarosa, almacenado a 10°C durante 8 días.

Variable Respuesta	Fuente de variación P(>)	
	Inóculo	Tiempo
Textura	0.0001	0.0001

\*Significativo al 5%

**Tabla A.23** Análisis de medias por método de Duncan para la textura del músculo de pollo tratado con bacterias lácticas o nisina y 5% de sacarosa, almacenado a 10°C durante 8 días

Tratamiento	Fuerza (N)
Testigo	1738.53 <sup>a</sup>
Nisina	1754.3 <sup>a</sup>
S. carnosus	1600.23 <sup>a</sup>
L. lactis	2046.13 <sup>b</sup>

\*Para cada grupo o variable, medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes

**Tabla A24.** Análisis de varianza para la textura del músculo de pollo inoculado con bacterias lácticas o nisina y 5% de sacarosa, almacenado a 10°C durante 8 días.

Variable Respuesta	Fuente de variación P(>)	
	Inóculo	Tiempo
Textura	0.0001	0.0001

\*Significativo al 5%

**Tabla A.25** Análisis de medias por método de Duncan para la textura del músculo de pollo tratado con bacterias lácticas o nisina y 2.5% de sacarosa, almacenado a 10°C durante 8 días

Tratamiento	2.5% sacarosa
Testigo	1680.73 <sup>a</sup>
Nisina	2026.43 <sup>b</sup>
S. carnosus	2051.96 <sup>b</sup>
L. lactis	2430.45 <sup>c</sup>

\*Para cada grupo o variable, medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes

### e) Producción de ácidos orgánicos

**Tabla A26.** Análisis de varianza para la producción de ácidos orgánicos del músculo de pollo inoculado con bacterias lácticas o nisina y 2.5% de sacarosa, almacenado a 10°C durante 8 días.

Variable Respuesta	Fuente de variación P(>)	
	Inóculo	Tiempo
Ácido láctico	0.0001	0.0001
Ácido acético	0.173	0.0001

\*Significativo al 5%

**Tabla A.27** Comparación de medias de la producción de ácidos orgánicos de pollo almacenado en condiciones de temperatura, sacarosa 2.5%

Inóculo	Ácido láctico
Testigo	6.1510 <sup>a</sup>
Nisina	6.2730 <sup>a</sup>
<i>S. carnosus</i>	6.3372 <sup>a</sup>
<i>L. lactis</i>	6.8356 <sup>b</sup>

\*Para cada grupo o variable, medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes

### g) Análisis microbiológicos

**Tabla A.28.** Análisis de varianza para variación en la población de microorganismos indicadores en el músculo de pollo tratado con BAL o nisina + microorganismos indicadores y sacarosa 5%, y almacenado a 10°C durante 8 días

Tratamiento	Fuente de variación P(>)	
	Inóculo	Día
Enterobacterias + BAL o nisina	0.0001	0.0001
Pseudomonas + BAL o nisina	0.0001	0.0001
Listeria + BAL o nisina	0.0001	0.0001

\*Significativo al 5%

**Tabla A.29.** Análisis de varianza para variación en la población de microorganismos indicadores en el músculo de pollo tratado con BAL o nisina + microorganismos indicadores y sacarosa 2.5%, y almacenado a 10°C durante 8 días

Tratamiento	Fuente de variación P(>)	
	Inóculo	Día
Enterobacterias + BAL o nisina	0.0001	0.0001
Pseudomonas + BAL o nisina	0.0001	0.0001
Listeria + BAL o nisina	0.0001	0.0001

## h) Producción de aminos biogénicas

**Tabla 6.20.** Análisis de varianza para la producción de aminos en el músculo de pollo tratado con BAL o nisina y con una mezcla de BAL o nisina + microorganismos indicadores y sacarosa 5%, y almacenado a 10°C durante 8 días

Variable Respuesta	Tratamiento	Mezcla	Tiempo
	(BAL)	(BAL o nis + indicadores)	
Putrescina	0.0001	0.0001	0.0001
Cadaverina	0.0001	0.0001	0.0001

\*Significativo al 5%

**Tabla 6.25** Análisis de varianza para la producción de aminos en el músculo de pollo tratado con BAL o nisina y con una mezcla de BAL o nisina + microorganismos indicadores y sacarosa 5%, y almacenado a 10°C durante 8 días

Variable Respuesta	Variables respuesta		
	Tratamiento	Mezcla	Día
	(BAL)	(BAL o nis + indicadores)	
Putrescina	0.0001	0.0001	0.0001
Cadaverina	0.0001	0.0001	0.0001