



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

VIDA DE ANAQUEL DE PRODUCTOS CÁRNICOS CON  
BASE EN CARNE MOLIDA DE RES CON DIVERSOS  
TRATAMIENTOS DE CONSERVACIÓN

TESIS  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:  
LORENZO GÓMEZ CÁRDENAS

TUTOR  
MARÍA DE LA SALUD RUBIO LOZANO

COMITÉ TUTORAL  
FRANCISCA AIDA ITURBE CHIÑAS  
MARÍA DEL PILAR CASTAÑEDA SERRANO



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIAS

De forma muy especial y con mucho cariño a la Maestra en Ciencias Ana Laura Soto López, por todo su apoyo, confianza y por estar conmigo en todo momento.

A un gran amigo en esta maestría, el Maestro en Ciencias Martín Castro Briones.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. María de la Salud Rubio Lozano, por el apoyo y la confianza brindados para la realización de esta tesis. Gracias.

A la M. en C. Francisca Iturbe Chiñas y a la Dra. Pilar Castañeda Serrano, por su tiempo y comentarios para la realización de esta tesis.

A la Dra. Edith Ponce Alquicira, por su gran disposición y comentarios siempre constructivos hacia este trabajo y por permitirme utilizar las instalaciones del Laboratorio de Bioquímica de Macromoléculas de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

A la Dra. María del Carmen Wachter Rodarte por su amabilidad y disposición para la revisión de la tesis.

Al Dr. Leonardo Vega por las facilidades otorgadas para la obtención de los productos de PURAC.

A la M. en B. Yenizey Álvarez Cisneros por la ayuda e información brindadas.

A Isadora, Miriam, Magda, y Víctor del Laboratorio de Bioquímica de Macromoléculas.

## RESUMEN

El poder aplicar métodos que nos permitan alargar y mantener en buen estado de conservación el producto cárnico, siempre serán favorables, para así evitar factores como la contaminación bacteriana del producto, mejorando la vida de anaquel y el tiempo de exposición al consumidor. El ácido láctico y las bacteriocinas se pueden utilizar como conservadores biológicos en los alimentos. El objetivo fue evaluar el efecto de la utilización de cuatro diferentes tratamientos antimicrobianos sobre la vida de anaquel y la calidad sensorial de un producto a base de carne molida de res, así como la eficacia que pueden mostrar para mantener un adecuado control sanitario. Se elaboró un producto cárnico. Se dividió en tres grupos, uno con antimicrobianos dependientes del ácido láctico, otro con nisina y ácidos orgánicos y el control. La administración de los tratamientos antimicrobianos fue del 3% del peso del producto terminado para la nisina, el lactato de sodio y lactato de potasio. El acetato-lactato se adicionó al 1% del producto terminado. El producto se inoculó con un cultivo de *E. coli* a una concentración de  $3.65 \times 10^8$  UFC/mL y permaneció en refrigeración hasta su posterior análisis (color, pH y microbiológico). De los cuatro tratamientos analizados, el uso de nisina dio al producto cárnico un adecuado control sanitario durante el periodo de almacenamiento. De igual forma los valores de color y pH de la carne se mantuvieron uniformes. Estos resultados nos permiten afirmar que el uso de productos que le puedan conferir una protección extra al procesado cárnico, siempre se deberán tomar en cuenta, pues además de proporcionar seguridad sanitaria y un buen aspecto durante su vida de anaquel al consumidor final, se le podrá dar un valor agregado.

**Palabras clave:** Vida de anaquel; Bacterias ácido lácticas; Nisina; Lactato de sodio o potasio; Bacteriocina.

## ABSTRACT

The power to apply methods that allow us to extend and maintain a good state of repair the meat product, will always be favourable factors as to avoid bacterial contamination of the product, improving shelf life and length of exposure to the consumer. The lactic acid and bacteriocins can be used as biological conservatives in food. The aim was to assess the effect of using four different antimicrobial treatments on the shelf life and sensory quality of a product based on Ground Beef and effectiveness that can show to maintain an adequate sanitary control. It produced a meat product. It is divided into three groups with antimicrobial dependent lactic acid, one with nisin and organic acids and control. The administration of antimicrobial treatments was 3% by weight of the finished product for nisin, lactate and sodium potassium lactate. The acetate-lactate was added to 1% of the finished product. The product was inoculated with a crop of *E. coli* at a concentration of  $3.65 \times 10^8$  CFU/mL and remained in refrigeration until further analysis (color, pH and microbiological). Of the four treatments analyzed, the use of nisin gave the meat product adequate sanitary control over the storage period. Likewise color values and pH of meat remained uniform. These results demonstrate that the use of products that can confer an extra protection to processed meat, always be taken into account, as well as providing health security and a good appearance during their shelf life to the ultimate consumer, he may be give added value.

**Keywords: Shelf life; Lactic acid bacteria; Nisin; Sodium or potassium lactate; Bacteriocin.**

# ÌNDICE

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
Dedicatorias	
Agradecimientos	
Resumen	I
Abstract	II
Índice	III
Lista de cuadros	VI
Lista de figuras	VI
<b>1 Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2 Antecedentes</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Importancia económica de la carne en México</b>	<b>2</b>
<b>2.2 Parámetros de calidad de la carne</b>	<b>3</b>
<b>2.2.1 pH</b>	<b>3</b>
<b>2.2.2 Color</b>	<b>3</b>
<b>2.3 Origen, tipo e importancia de los microorganismos presentes en la carne de res</b>	<b>5</b>
<b>2.3.1 Factores que inducen o favorecen la contaminación alimentaria</b>	<b>6</b>
<b>2.3.2 Contaminación endógena</b>	<b>8</b>
<b>2.3.3 Contaminación exógena</b>	<b>8</b>
<b>2.3.4 Contaminación de los alimentos y sus consecuencias para la salud pública</b>	<b>9</b>
<b>2.3.5 Principales procesos de transmisión alimentaria</b>	<b>11</b>
<b>2.3.6 Comportamiento de los microorganismos en los alimentos</b>	<b>12</b>
<b>2.4 Factores que contribuyen al crecimiento de microorganismos en la carne de res</b>	<b>13</b>
<b>2.4.1 Factores intrínsecos</b>	<b>14</b>
<b>2.4.1.1 pH</b>	<b>14</b>
<b>2.4.1.2 Actividad de agua (Aw)</b>	<b>16</b>
<b>2.4.1.3 Potencial óxido-reducción (Eh)</b>	<b>16</b>

2.4.1.4	Constitución nutritiva del alimento	18
2.4.1.5	Constituyentes antimicrobianos	19
2.4.2	Factores extrínsecos	20
2.4.2.1	Temperatura	20
2.4.2.2	Humedad relativa	22
2.4.2.3	Presencia y concentración de gases en el ambiente	23
2.4.2.4	Influencia del CO <sub>2</sub> y O <sub>2</sub>	23
2.5	Control del deterioro de la carne fresca	25
2.5.1	Métodos de conservación	25
2.5.2	Empacado al Vacío	28
2.5.3	Empacado en Atmósferas Modificadas y Controladas	29
2.5.4	Alteración de la carne envasada al vacío (Vida de Anaquel)	30
2.5.5	Métodos para alargar la vida de anaquel en productos	31
	cárnicos empacados al vacío	
2.6	Bacterias lácticas y sus metabolitos	33
2.6.1	Clasificación	35
2.6.2	Ácido láctico	37
2.6.3	Ácido acético	37
2.6.4	Dióxido de carbono	38
2.6.5	Diacetilo	38
2.6.6	Reuterina	39
2.6.7	Modo de acción (Bacteriocinas)	39
2.6.8	Bacteriocinas representativas	40
2.6.8.1	Nisina	40
2.6.8.2	Pediocina	41
2.6.8.3	Plantaricinas E/F y J/K	42
2.6.8.4	Divergicina A	42
2.6.8.5	Helveticina J	43
2.7	Ácidos orgánicos	43
2.7.1	Ácidos orgánicos en los alimentos	45
2.7.2	Ácido cítrico y citratos	46
2.7.3	Ácido acético y acetato	46



2.7.4	Ácido láctico y lactato	47
3	Objetivos	50
3.1	Objetivo general	50
3.2	Objetivos específicos	50
4	Material y Métodos	51
4.1	Estrategia General	51
4.2	Materia Prima	51
4.2.1	Carne	51
4.2.2	Antimicrobianos	52
4.3	Desarrollo experimental	52
4.3.1	Elaboración de producto cárnico de res	52
4.3.2	Etapa 1	53
4.3.3	Etapa 2	54
4.3.4	Determinación de color	54
4.3.5	Determinación de pH	55
4.3.6	Análisis microbiológico	55
4.3.7	Análisis sensorial	55
4.4	Análisis estadístico	56
5	Resultados	57
5.1	Etapa 1	57
5.2	Etapa 2	61
5.3	Análisis sensorial	66
6	Discusión	68
7	Bibliografía	76
8	Anexos	88
	Anexo A. Cuestionario evaluación sensorial de carne de res.	89
	Anexo B. Fichas técnicas antimicrobianos.	91

## LISTA DE CUADROS

	Página
<b>Cuadro 1.</b> Zonas térmicas para la multiplicación de microorganismos.	21
<b>Cuadro 2.</b> Clasificación de bacteriocinas	36
<b>Cuadro 3.</b> Efecto de los tratamientos antimicrobianos sobre el conteo de mesófilos y coliformes de hamburguesas refrigeradas.	62
<b>Cuadro 4.</b> Efecto de los días de almacenamiento sobre el conteo de mesófilos y coliformes de hamburguesas tratadas con diferentes antimicrobianos.	63
<b>Cuadro 5.</b> Efecto de los tratamientos antimicrobianos sobre el sabor, la textura y el aspecto general de las hamburguesas.	67

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Efecto de la interacción del tratamiento antimicrobiano y días en almacenamiento sobre las UFC de muestras de carne molida inoculadas con <i>E. coli</i> .	57
<b>Figura 2.</b> Efecto de la interacción de tratamiento antimicrobiano y días en almacenamiento sobre la luminosidad (L) de color de muestras de carne molida inoculadas con <i>E. coli</i> .	59
<b>Figura 3.</b> Efecto de la interacción de tratamiento antimicrobiano y días en almacenamiento sobre el color rojo (a) de muestras de carne molida inoculadas con <i>E. coli</i> .	59
<b>Figura 4.</b> Efecto de la interacción de tratamiento antimicrobiano y días en almacenamiento sobre la característica de pH de muestras de carne molida inoculadas con <i>E. coli</i> .	60
<b>Figura 5.</b> Efecto de la interacción del tratamiento antimicrobiano y días en almacenamiento sobre el parámetro L de color de muestras de carne molida.	64
<b>Figura 6.</b> Efecto de la interacción del tratamiento antimicrobiano y días en almacenamiento sobre el parámetro a de color de muestras de carne molida.	65
<b>Figura 7.</b> Efecto de la interacción de tratamiento antimicrobiano y días en almacenamiento sobre la característica de pH de muestras de carne molida.	66

## 1. INTRODUCCIÓN

Los productos cárnicos con un previo procesamiento ocupan un lugar importante en el mundo moderno, pues ahorran tiempo al ama de casa en la preparación del mismo. Además de los requerimientos de inocuidad, los productos deben cumplir con aspectos sensoriales, de frescura, aceptación y alta calidad. Uno de los principales objetivos al trabajar con productos frescos procesados, es poder limitar su contaminación o evitar la proliferación de microorganismos que alteren el producto cárnico. La aplicación de métodos que nos permitan alargar y mantener en buen estado de conservación el producto cárnico, es beneficiosa, pues mejora la vida de anaquel y el tiempo de exposición al consumidor (Wong, 1994).

El uso del ácido láctico como conservante de los alimentos se debe a su acción antioxidante, detiene la oxidación de las grasas y retrasan la alteración oxidativa del alimento. Al ser un producto fisiológico, es totalmente inocuo. La mayor efectividad del ácido láctico para inhibir las bacterias y se da en rangos de pH de 2.9 a 3.6 (Wong, 1994).

Por otro lado, la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas representa un gran potencial para la industria alimenticia ya que se pueden utilizar como conservadores biológicos y tienen la ventaja de ser proteínas que al biodegradarse no forman compuestos secundarios peligrosos. Las bacteriocinas actúan destruyendo la membrana citoplasmática a través de la formación de poros, provocando la salida de compuestos esenciales para la célula (Garriga *et al.* 2001). Las bacteriocinas son producto del metabolismo de las bacterias ácido lácticas (BAL). A estos componentes se les presta mucha atención por su potencial uso como conservadores naturales (Cleveland *et al.* 2001). Estos productos muestran un gran potencial para aplicarse como aditivos a los alimentos, para el control tanto de microorganismos deteriorantes como patógenos (Yang y Ray 1994; Muriana 1996).

En este estudio se evaluó el efecto de la utilización de cuatro diferentes tratamientos antimicrobianos sobre la vida de anaquel de un producto a base de carne molida de res, así como la eficacia que pueden mostrar para mantener un adecuado control sanitario.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Importancia económica de la carne en México**

La apertura comercial con países como Japón, Corea o China puede representar una oportunidad de negocio para los productores nacionales de carne de bovino integrados a una cadena productiva, mediante la cual se puedan desarrollar acuerdos y convenios para abastecer un nicho de mercado con características diversificadas y muy específicas, pero que están dispuestos a pagar un gran valor por los productos que satisfagan sus necesidades y les de certidumbre de consumir productos de calidad (SECOFI, 2006).

Sin embargo, también existe un mercado nacional insatisfecho que es capaz de exigir las mismas características que cualquier mercado internacional y tiene la posibilidad económica de pagar por esa calidad. En la actualidad este segmento del mercado está siendo cubierto principalmente por productores de EUA a través de su comercializadora US Meat Export Federation, la cual ha incursionado en las tiendas de autoservicio de las principales ciudades del país (SECOFI, 2006).

Por lo que es necesario que las principales cadena productoras de carne de bovino a nivel nacional perciban esa necesidad de una mayor integración en cada uno de sus eslabones, poniendo mayor énfasis en aquellos que son mas delgados y sensibles como puede ser el productor de pie de cría y becerros, para competir en mejores condiciones con los productos importados, así como, lograr producir a precios competitivos en un mercado internacional cada vez más exigente y preocupado por su salud, debido a la frecuente aparición de enfermedades que restringen el comercio y el consumo (SECOFI, 2006).

Por otro lado, también es importante contar con un desarrollo de nuevos productos a partir de la carne de bovino, y empaques que conserven sus características principales, para satisfacer las nuevas tendencias de las demandas de los consumidores, principalmente en las grandes ciudades. Por lo que es de gran importancia la participación activa de instituciones educativas, centros de investigación y desarrollo tecnológico, así como, la industria privada (SECOFI, 2006).

## **2.2 Parámetros de calidad de la carne**

### **2.2.1 pH**

El pH es el logaritmo negativo de la concentración de protones o iones hidrógeno. La velocidad y la magnitud del descenso del pH después del sacrificio es posiblemente la causa individual más importante de la variación existente en calidad de la carne. La velocidad de reducción del pH y la temperatura a la que se produce afectan a la desnaturalización proteica en el músculo post-mortem. Una descenso rápido de pH mientras la canal aún está a temperatura alta (>37°C) provoca la desnaturalización de las proteínas miofibrilares (Wong, 1994). El descenso hasta un pH cercano al punto isoeléctrico (5,0-5,1) de las proteínas musculares reduce considerablemente su capacidad de retener agua. El resultado son carnes blancas y exudativas debido a la poca capacidad de retener líquidos, carnes PSE. Si el descenso es insuficiente, el resultado es el contrario, carne DFD (Wong, 1994). Una carne DFD no presenta problemas de palatabilidad debido a su alta capacidad de retención de agua, por lo que en algunas ocasiones es usada para elaborados. Sin embargo, presenta problemas de estabilidad y seguridad alimentaria. Por otro lado, una carne PSE es totalmente inaceptable por el consumidor debido a su aspecto y palatabilidad. Los cambios en el pH después del sacrificio son básicamente debidos a la degradación del glucógeno a ácido láctico en condiciones anaerobias (Wong, 1994).

### **2.2.2 Color**

El color es un fenómeno físico, relacionado con las diferentes longitudes de onda en la zona visible del espectro electromagnético, la cual percibimos a través de los órganos de la visión, obteniendo un resultado perceptual de la incidencia sobre nuestra retina de una radiación electromagnética, cuya longitud de onda está comprendida entre 370 y los 730 nm. Este factor interpreta una variedad de características que nos ayudan a determinar la calidad de la carne. Por ejemplo, relacionamos generalmente la madurez o el grado de descomposición de la carne con el color. También el color influye de tal manera que se puede percibir como apetitivo o desagradable. Es la primera

característica que percibe el consumidor. Los colores oscuros se asocian a carne dura, poco jugosa y con bastante tiempo en el anaquel (Prandl, 1999).

El color dependerá básicamente de la concentración de los pigmentos, concretamente de la mioglobina y del estado en el que encontremos la mioglobina en la carne. La mioglobina presenta en su grupo hemo un ión de hierro reducido o ión ferroso que cuando los niveles de oxígeno son altos se oxida. La oximioglobina presenta el grupo hemo ligado de forma reversible a una molécula de oxígeno (Prandl, 1999). La metamioglobina puede provenir de la mioglobina o de la oximioglobina por oxidación del grupo hemo. La formación de metamioglobina en la carne fresca es reversible.

Las tres formas se encuentran en equilibrio predominando en la superficie la oximioglobina y en el interior de la carne la mioglobina. La metamioglobina aparecerá con el tiempo facilitando esta aparición la bajada del pH posterior al rigor mortis. También las enzimas implicadas en pasar la metamioglobina a mioglobina se desnaturaliza por lo que la carne se va tornando de coloración parda (Prandl, 1999).

La mioglobina es usada en el músculo vivo para almacenar y transportar el oxígeno. La cantidad o concentración de mioglobina en la carne está relacionado con varios factores, como la especie, la edad del animal, y el tipo de fibra muscular. Por ejemplo, la carne de res contiene más mioglobina que el cerdo, lo cual obviamente explica por qué la carne de res es más roja que la de cerdo. A medida que los animales envejecen la concentración de mioglobina aumenta. El 95% del hierro de la carne se encuentra en la mioglobina (Prandl, 1999).

Cuando el hierro de la mioglobina se oxigena u oxida, ocurren cambios en el color de la carne. La forma inicial de la mioglobina previo a que las superficies cortadas sean expuestas al aire es de un color rojo púrpura. A través del contacto con el aire (oxigenación), el color se convierte en un rojo brillante que se conoce como "floreCIMIENTO." A medida que la superficie es expuesta aún más al oxígeno (oxidación), el color rojo brillante se torna a marrón claro (Prandl, 1999).

Existen otros pigmentos como los citocromos, pero su contribución al color es menor. En el tejido muscular de un animal bien desangrado la mioglobina constituye 80-90% del pigmento total (Prandl, 1999).

El color detectado por el ojo es el resultado de la combinación de varios factores. Cualquier color específico tiene tres atributos conocidos como tinte (hue), saturación (chroma) y luminosidad (value). El tinte describe lo que normalmente se detecta como color primario (rojo, azul o amarillo), es decir, se relaciona con el largo de onda de la radiación de luz. La saturación describe la intensidad de un color primario con respecto a la cantidad de luz blanca que está mezclada con éste. La luminosidad de un color es un indicador de la claridad del color (Price, 2001).

El sistema Hunter fue diseñado y es ampliamente utilizado en la evaluación del color en los alimentos. El procedimiento, también conocido como color uniforme, se basa en la teoría de los colores (radiación de cierta longitud de onda) opuestos a la percepción visual del color. Esta teoría supone que existe un estado de conexión-señal intermedia entre los receptores de luz en la retina y el nervio óptico que transmite las señales de color al cerebro. Con este mecanismo de conexión, las respuestas al color rojo son comparadas con verde y resulta en una dimensión de color de rojo a verde, la cual es representada por el símbolo  $a^*$ . Las respuestas al color verde son comparadas con azul, que resulta en una dimensión de color de amarillo a azul, representada por el símbolo  $b^*$  (Price, 2001).

La tercera dimensión de color es la luminosidad, representada por  $L^*$ . Esta escala Hunter es fácil de interpretar y utiliza tres parámetros:  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ . El parámetro  $L^*$  mide las tonalidades de blanco (100) hasta negro (0),  $a^*$  mide las tonalidades de rojo (+) hasta verde (-) y  $b^*$  las de amarillo (+) hasta azul (-) (Price, 2001).

### **2.3 Origen, tipo e importancia de los microorganismos presentes en la carne de res**

Las enfermedades producidas por bacterias son de dos tipos: intoxicaciones e infecciones. Las intoxicaciones son causadas por la ingestión

de alimentos previamente contaminados por gérmenes que producen toxinas y son éstas las que producen la enfermedad. Las infecciones, por otro lado, son producidas por la ingestión de los alimentos contaminados con bacterias vivas, que crecen y se establecen en el huésped, produciendo así la enfermedad.

La contaminación alimentaria estudia aquellos factores que, incidiendo sobre alimentos y bebidas, provocan alteraciones o situaciones de peligro en el hombre tras el consumo de estos últimos (Atlas R.M, 2002).

Los microorganismos y agentes químicos ingresan en cualquier momento en la cadena alimentaria (Atlas R.M, 2002). Entre las fuentes de contaminación encontramos:

- El medio ambiente como fuente de contaminación (suelo, agua, aire).
- Contaminación a través de los propios seres vivos (plantas y vegetales, animales, pescado, hombre).
- Productos derivados de los seres vivos (alimentos para animales, leche, huevo).
- Fuentes de origen industrial (efluentes, equipo, ingredientes, envases, proceso tecnológico).

Dependiendo del factor causante de la contaminación se distinguen clásicamente dos tipos de contaminación:

A) Contaminación biótica: provocada por la presencia de macroorganismos, parásitos, virus y/o productos tóxicos de origen biológico en los alimentos.

B) Contaminación abiótica: constituida por la presencia en los alimentos de productos químicos o residuos de los mismos, así como contaminantes de naturaleza radioactiva (Atlas R.M, 2002).

### **2.3.1 Factores que inducen o favorecen la contaminación alimentaria**

Teniendo presente las clases de microorganismos asociados con los alimentos vegetales y animales en sus estados naturales, es posible predecir que microorganismos pueden presentarse en los productos alimenticios elaborados a partir de ellos y debemos sumarle una microbiota añadida fruto del proceso de manipulación y conservación alimentaria. Ambas floras son el



origen de la distribución general de microorganismos en los alimentos y determinan la calidad microbiológica de los mismos (Atlas R.M, 2002).

Son 5 los grupos de factores que intervienen en la génesis de las asociaciones microbianas:

1) Microflora contaminante del alimento, que puede tener varios orígenes: interno ó humano.

2) Factores intrínsecos del propio alimento: Aw, pH, potencial de oxidorreducción, nutrientes, sustancias inhibidoras, estructura y barreras protectoras.

3) Factores extrínsecos aplicados al alimento:

- Preparación industrial y procesado alimentario
- Tratamientos térmicos
- Irradiación
- Cambios en la composición química de los alimentos
- Contaminación durante el procesado

4) Factores extrínsecos ligados a las condiciones de almacenamiento:

- Temperatura de almacenado
- Humedad relativa de almacenado

5) Factores implícitos de la propia flora contaminante:

- Características específicas de crecimiento
- Simbiosis
- Antagonismo

Es capital que la acción de los numerosos factores inhibidores mencionados con anterioridad sea aditiva. De ahí que numerosos procesos de conservación se basen en una combinación de algunos de los factores citados para frenar las asociaciones microbianas, ya que su acción individualizada no es suficientemente inhibidora. El ejemplo clásico es la fabricación de embutidos: en el que se suman el descenso de la Aw, la adición de nitrito, el ahumado, el pO<sub>2</sub>, el pH, la temperatura y el almacenamiento (Atlas R.M, 2002).

### **2.3.2 Contaminación endógena**

Existe cuando los microorganismos presentes en el organismo animal pasan a los productos obtenidos, como carne, leche, huevo. En animales sanos esto constituye una excepción, puesto que el organismo es capaz normalmente de rechazar los MO de manera que estos quedan localizados en sus ubicaciones naturales, pero si se registran alteraciones en la salud, o cuando se sufren estados de estrés, puede romperse este equilibrio germen-hospedador, aunado a sobrecargas de distintos tipos pueden agotar la resistencia corporal y provocar una infección antes del sacrificio, sin ninguna alteración clínica visible ni alteraciones patológicas, con el peligro de no poder detectarlas durante la inspección de la canal. Si la contaminación esta dada por microorganismos zoonóticos capaces de estar presentes de forma inaparente pueden ser un peligro evidente para el consumidor. Por lo que trabajar con animales sanos, en un ambiente limpio sin estrés son premisas para evitar una contaminación primaria.

### **2.3.3 Contaminación exógena**

Esta es mucho mas frecuente y es como una forma de paso de los microorganismos a los alimentos, con fuentes muy variadas, las cuales comprenden todas las posibilidades de contaminación existentes fuera del organismo animal vivo, entre las cuales están: el hombre, animales domésticos, suelo, agua, vegetales, insectos, roedores, polvo, suciedad, utensilios, maquinas, superficies, aditivos, etc. El ingreso de microorganismos a los alimentos puede ser directo o indirecto o por contaminación cruzada. Se practica la descontaminación cuando se liberan los alimentos de microorganismos o de una fracción de la microbiota, sobretodo por procesos tecnológicos.

La microbiota contaminante de un alimento terminado viene determinada cuantitativa y cualitativamente por muchas variantes tanto objetivas como subjetivas, por lo que de alimentos idénticos no pueden obtenerse iguales cuentas de microorganismos, con la excepción de los productos estériles. Sin embargo, ya que la microbiota puede ser influida por los diferentes procesos de

fabricación y por las características propias de los alimentos la flora microbiana normal presenta variaciones en cuanto a la cantidad y especies de microorganismos. A partir del conocimiento de los procesos tecnológicos seguidos en la elaboración y almacenado de los alimentos y del grado de contaminación de las materias primas se puede emitir un vaticinio sobre la flora bacteriana que se espera en el producto terminado. Inversamente a partir de análisis microbiológicos practicados sobre un alimento, se pueden tener conclusiones sobre las condiciones higiénicas y tecnológicas empleadas en la elaboración del alimento.

La contaminación de los alimentos esta estrechamente relacionada con la conservación y el grado de riesgos sanitarios, la cantidad y variedad (espectro) de los gérmenes debe de considerarse conjuntamente, como una sola unidad, ya que un elevado número de microorganismos benéficos no indica defectos sanitarios como en los productos lácteos. Cuando menor cantidad de microorganismos ingrese en el proceso de elaboración menor será su carga en el producto terminado.

#### **2.3.4 Contaminación de los alimentos y sus consecuencias para la salud pública**

Cuando nos referimos a la contaminación de los alimentos estamos haciendo mención, que dentro de ellos se encuentran sustancias extrañas o indeseables. Estas pueden modificar las características naturales de los alimentos, alterando el producto original o acortando su vida útil.

Frecuentemente la elaboración de alimentos libre de contaminación no depende solamente del establecimiento donde es producido, sino también influyen las personas que manipulan las materias primas (higiene) y los procesos de manufactura. El periodo de contaminación de los alimentos se puede dar desde el instante mismo cuando es cosechado o el animal sacrificado, continuando por su etapa de industrialización y hasta cuando lo preparan en el hogar para ser ingerido.

Los dos tipos de contaminantes más frecuentes son los biológicos y los químicos, aunque en menor medida los físicos, atribuibles principalmente a la

elaboración de los alimentos también son apreciables. Las bacterias, virus, hongos y parásitos son los responsables del primer tipo, estos pueden penetrar en los alimentos durante su producción, elaboración industrial, transporte, almacenamiento, distribución y su preparación en el hogar.

Las plantas o animales enfermos o que actúan como vectores de patógenos (organismos dañinos) se los considera como las fuentes principales de contaminación. También los alimentos frescos que son transportados a temperatura ambiente, son susceptibles de sufrir la proliferación de organismos que los deterioran, haciéndolos no aptos para el consumo humano. Por su parte la manipulación de alimentos en condiciones de higiene deficientes y la utilización de agua que posee organismos patógenos es otra de las fuentes más comunes de contaminación, que se da frecuentemente en el hogar. Continuando con este tipo de problema alimenticio, es muy común un tipo de alteración que se denomina contaminación cruzada, ésta es muy habitual y peligrosa. Se da cuando organismos patógenos, por lo general bacterias, son transferidos desde alimentos crudos, manos, cubiertos, equipos, herramientas a los alimentos sanos.

La contaminación química esta teniendo cada vez más importancia debido a su alta peligrosidad. Estas sustancias se incluyen en los alimentos como impurezas o aditivos. Las impurezas más problemáticas son los metales, plaguicidas y fertilizantes. Los metales más importantes desde el punto de vista toxicológico son: plomo, mercurio, cadmio, cobalto, estaño y manganeso, éstos se encuentran comúnmente en cereales y peces provenientes de áreas cercanas a centros industriales.

Por su parte la contaminación física resulta de la presencia de elementos extraños en el interior de los alimentos. Estos en la mayoría de los casos fueron mezclados accidentalmente con el alimento durante su producción. Los ejemplos más comunes son: vidrios, metales, polvo, hilachas, fibras, pelos, introducidos en los comestibles entre otros (Alan H., 1995).

Aunque el problema es menos grave en los países desarrollados, la propia OMS considera que las autoridades sanitarias deberían sensibilizarse aún más del impacto sanitario que supone este tipo de enfermedades.

Los datos epidemiológicos que ofrecen la mayor parte de los países industrializados señalan que de todas las causas de enfermedades de origen bacteriano, *Salmonella* es la más importante de las mismas.

Los agentes biológicos que presentan un riesgo alimentario pueden dividirse en tres grandes grupos dependiendo del peligro que suponen:

#### GRUPO 1:

Pertenecen a este grupo los agentes de riesgo severo.

*Clostridium botulinum*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella enterica* subsp. Typhi y Paratyphi, virus de la Hepatitis A y E, *Brucella spp.*, *Vibrio cholera* O1 y O139, *Vibrio vulnificus*, *Taenia solium* y *Trichinella spiralis*.

#### GRUPO 2:

Riesgo moderado pero que pueden tener una importante difusión.

*Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Escherichia coli* enteropatógeno, *Streptococcus pyogenes*, Rotavirus, virus Norwalk, *Entamoeba histolytica*, *Diphyllobotrium latum*, *Ascaris lumbricoides*, *Cryptosporidium parvum*

#### GRUPO 3:

Riesgo moderado, difusión limitada.

*Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *C. perfringens*, *S. aureus*, *V. cholera* no O1 y O139, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolítica*, *Giardia lamblia*, *Taenia saginata* (Adams M.R, 1997).

### **2.3.5 Principales procesos de transmisión alimentaria**

Dentro de los agentes biológicos contaminantes de los alimentos que comportan riesgo para la salud pública están los que se mencionan a continuación:

- Agentes productores de toxiinfecciones e intoxicaciones alimentarias como botulismo, salmonelosis, intoxicación por enterotoxina estafilocócica. Las infecciones e intoxicaciones alimentarias de origen microbiano son procesos morbosos de carácter fundamentalmente gastroentérico agudo, con notable y

principal sintomatología tóxica, que aparecen después de la ingestión de alimentos contaminados por microorganismos o con metabolitos elaborados por ellos. Se diferencian así de otras enfermedades transmitidas por los alimentos (algunas de ellas son zoonosis transmisibles) que tienen un período de incubación mucho más prolongado y una patogenia totalmente diferente (brucelosis, triquinelosis, carbunco, etc.) (Adams M.R, 1997).

- Virus transmitidos por los alimentos, entre estos, los virus gastroentéricos son los principales responsables.
- Agentes productores de micotoxicosis, de los que las aflatoxinas son las más importantes.

### **2.3.6 Comportamiento de los microorganismos en los alimentos**

Requisito previo para la persistencia o multiplicación de los microorganismos en el caso de la contaminación de las superficies es la adherencia de los microorganismos. Poco tiempo después de producirse la contaminación pueden crearse estructuras filamentosas constituidas por mucopolisacáridos, que sirven para que los microorganismos se anclen en las superficies y después de esto es difícil eliminarlos de los alimentos, ni siquiera con lavados intensos. En superficies secas solamente se esperan colonizaciones de microorganismos, pero si las condiciones son húmedas se puede presentar la contaminación. En su colonización hacia el interior del alimento los microorganismos se encuentran con barreras naturales como son: las facias musculares, cantidad de grasa, cortezas de las canales, la cáscara de huevo, entre otros. Sin embargo cuando las condiciones son favorables para los microorganismos estas barreras no son un obstáculo para la colonización del alimento (Alan H., 1995).

El destino seguido por los microorganismos responde a tres posibilidades:

- Inactivación
- Supervivencia
- Multiplicación

En los alimentos la duración de la fase de contaminación esta determinada por:

- Dosis contaminantes.- Cuanto mayor es esta menor es la fase logarítmica y viceversa.
- Género, Especie y Fase de Crecimiento.- los gérmenes con tiempos cortos de multiplicación inicia más rápidamente su proliferación.
- Microbiota.- Los microorganismos se imponen por lo general con mayor diferencial en cuanto más variada es la flora microbiana.
- Factores de Influencia de los Alimentos.- Esta influenciada por las condiciones medioambientales que el alimento provee.
- Capacidad de Penetración.- Facilidad de los microorganismos para atravesar las barreras naturales de los alimentos.
- Capacidad Invasora.- Facilidad de penetración en las células epiteliales.
- Producción de Toxinas.- Formación de productos metabólicos con diferentes efectos tóxicos fuera de las células.

#### **2.4 Factores que contribuyen al crecimiento de microorganismos en la carne de res**

El crecimiento microbiano es un proceso autocatalítico; no habrá crecimiento sin la presencia de al menos una célula viable y la tasa de crecimiento aumentará de acuerdo con la cantidad de biomasa viable presente.

La resistencia de los microorganismos a diversas condiciones desfavorables como el calor, frío, pH, etc; dependen en gran medida de la fase de crecimiento en la que se encuentran (Adams M.R, 1997).

Los alimentos frescos o naturales suelen contener una población microbiana mixta. La velocidad de crecimiento de cada organismo depende de muchos factores, estos fueron clasificados en diferentes grupos:

- Factores intrínsecos: Dependen de las características del sustrato de crecimiento, es decir, del propio alimento. Entre estos se encuentran los parámetros químicos como la cantidad de agua disponible, los tipos y niveles de nutrientes disponibles, el pH y el potencial Redox.
- Factores Extrínsecos: Los impuestos desde el exterior como la temperatura, el aire (O<sub>2</sub>), presencia de gases luz y la humedad.

- Factores implícitos: Estos dependen de la microflora particular dominante que inicialmente se desarrolla en respuesta a factores intrínsecos o extrínsecos. Pueden ser sinérgicos o antagónicos (Adams M.R, 1997).

Los efectos sinérgicos implican la alteración de las condiciones por un grupo de microorganismos de modo que otro grupo resulta favorecido; un organismo elimina una sustancia que es inhibidora para otro, un organismo que produce factores de crecimiento requeridos por el otro ó alteración microbiana del pH, del Eh, del contenido de agua o de la estructura del alimento, que favorecen el crecimiento de otros organismos (Casp A, 2003).

Los efectos antagónicos son análogos; un grupo de organismos puede eliminar un factor de crecimiento necesario para el crecimiento de otro, sintetizar una sustancia inhibidora para otro o crear un pH o un Eh adversos.

Existen factores relacionados con el procesado o tratamiento que se da a los alimentos, aquellos son consecuencia de los tratamientos aplicados durante la elaboración de alimentos tanto a escala industrial como a escala doméstica y estos modifican la composición de la microflora. Los tratamientos físicos como el calentamiento y la irradiación, los cambios llevados a cabo por la adición de compuestos químicos, por inoculación de organismos que producen ácidos ó por la adición de agentes conservadores (Casp A, 2003).

## **2.4.1 Factores intrínsecos**

### **2.4.1.1 pH**

En estado natural, la mayoría de los alimentos, como carnes, pescados y productos vegetales, son ligeramente ácidos. La mayor parte de las frutas son bastante ácidas y solo algunos alimentos, como la clara de huevo por ejemplo, son alcalino, Para preservar los alimentos, durante miles de años se ha venido aumentando su acidez, ya sea de manera natural, por fermentación, o artificial, por adición de ácidos débiles, con lo que se consigue inhibir la proliferación microbiana. La acidez puede ser un factor básico en la preservación, como en el caso de algunos alimentos fermentados tales como el yogur, la coliflor



fermentada o los pepinillos en vinagre, o tener un papel auxiliar, cuyo efecto se combina con el de otros factores tales como conservadores químicos, calor o actividad de agua (Wong P.C, 1994).

### Propiedades del pH y la acidez

El pH de un alimento es uno de los principales factores que determinan la supervivencia y el crecimiento de los microorganismos durante el procesado, el almacenaje y la distribución. Como el efecto de algunos otros factores depende en parte del pH, es a veces difícil separar el efecto del pH por sí mismo y el de otros factores influidos por el pH. Así por ejemplo, los microorganismos se ven afectados por el nivel de iones H<sup>+</sup> libres (el pH por sí mismo) y, además, por la concentración del ácido débil no disociado, la cual a su vez depende del pH. Los ácidos débiles no disociados (del ácido acético o láctico, por ejemplo) metabolizan dentro de la célula bacteriana, liberando H<sup>+</sup> que acidifica el interior de la célula hasta alcanzar niveles inhibitorios. Otros aniones no metabolizan y por lo tanto no acidifican el interior de la célula (Wong P.C, 1994).

Los valores bajos de pH pueden ayudar en la conservación de los alimentos de dos maneras: directamente, inhibiendo el crecimiento microbiano, e indirectamente, a base de disminuir la resistencia al calor de los microorganismos, en los alimentos que vayan a ser tratados térmicamente (Wong P.C, 1994).

Los alimentos conservados por fermentación láctica, derivan sobre todo de la leche (queso), de la carne (embutidos fermentados) y de productos vegetales (coliflor fermentada, encurtidos, etc.). La fermentación ocurre por inoculación con bacterias productoras de ácido, o por selección natural de las bacterias lácticas a partir de la flora natural del alimento. El crecimiento de la flora deseada se asegura proporcionando anaerobiosis y un nivel adecuado de sal, y controlando la temperatura. También se puede inhibir la alteración microbiana de algunos alimentos por acidificación directa, por ejemplo, con ácido acético, en el caso de pescado o productos vegetales (Wong P.C, 1994).

#### **2.4.1.2 Actividad de agua ( $A_w$ )**

Los microorganismos necesitan la presencia de agua, en una forma disponible, para crecer y llevar a cabo sus funciones metabólicas (Wong P.C, 1994). La mejor forma de medir la disponibilidad de agua es mediante la actividad de agua ( $A_w$ ). La  $A_w$  de un alimento se puede reducir aumentando la concentración de solutos en la fase acuosa de los alimentos mediante la extracción del agua o mediante la adición de solutos. Algunas moléculas del agua se orientan en torno a las moléculas del soluto y otras quedan absorbidas por los componentes insolubles de los alimentos. En ambos casos, el agua queda en una forma menos reactiva (Wong P.C, 1994).

Varios métodos de conservación utilizan estos conceptos. La deshidratación es un método de conservación de los alimentos basado en la reducción de la  $A_w$  (lo que se consigue eliminando el agua de los productos). También el agregado de solutos desciende la  $A_w$  lo cual se da durante el curado y salado, así como en el almíbar y otros alimentos azucarados (Wong P.C, 1994).

#### La actividad acuosa y la conservación de los alimentos

Muchos alimentos logran estabilidad desde el punto de vista microbiológico, eliminando el agua que contienen (deshidratación) o mediante el agregado de solutos hasta alcanzar un valor bajo de  $A_w$ .

La sal y el azúcar son los solutos que habitualmente se añaden a los alimentos para reducir la  $a_w$ . La preparación de jaleas, mermeladas y productos va acompañada de una extracción parcial del agua (concentración) mediante calentamiento. La adición de sal se utiliza en forma predominante en la carne, pescado y algunas verduras. La sal se añade directamente en seco o mediante salmuera dependiendo siempre de la naturaleza del producto (Wong P.C, 1994).

#### **2.4.1.3 Potencial óxido-reducción (Eh)**

El potencial redox es un factor selectivo importante en todos los ambientes, incluso en los alimentos, que probablemente influye en los

microorganismos presentes y en su metabolismo. Las diferencias observadas en los productos finales del metabolismo, discernibles por el consumidor por diferencias de color o sabor, pueden ser en algunos casos la consecuencia de diferencias redox (Wong P.C, 1994). En los alimentos picados (p. ej., productos cárnicos) o en los productos no homogéneos (p. ej., emulsiones), el potencial redox puede variar considerablemente de una parte a otra debido a altas concentraciones localizadas de diversos pares redox o de nutrientes como glucosa, fumarato o malato. Cuando la difusión gaseosa hacia el centro del alimento se encuentra restringida, pueden existir gradientes de potencial redox desde la atmósfera hasta las partes profundas del alimento (Wong P.C, 1994). El potencial redox indica las relaciones de oxígeno de los microorganismos vivos y puede ser utilizado para especificar el ambiente en que un microorganismo es capaz de generar energía y sintetizar nuevas células sin recurrir al oxígeno molecular. Los microorganismos aerobios necesitan valores redox positivos para crecer mientras que los anaerobios frecuentemente requieren valores redox negativos. En diferentes cultivos microbianos el valor redox puede oscilar dentro de un rango comprendido entre una cifra anaeróbica inferior a unos -420 milivoltios (mV) hasta una cifra aeróbica de aproximadamente +300 mV (Wong P.C, 1994).

#### El potencial redox en los alimentos

Aunque generalmente no se reconoce al potencial redox como un parámetro de proceso durante la preparación de los alimentos, es indudable que interactúa con el pH y las atmósferas gaseosas determinando la flora que altera a muchos alimentos e influye probablemente el desarrollo de aromas (tanto agradables como desagradables) (Wong P.C, 1994). El potencial redox de las trozos interiores de la carne es lo suficiente reducido como para prevenir el crecimiento de los aerobios (p. ej., pseudomonas, bacilos u hongos) pero el potencial redox bajo (post-rigor) estimula el crecimiento de enterobacteriaceas y clostridios. La velocidad y la extensión de la disminución del potencial redox (volviéndose más electronegativo) en los productos alimenticios que carecen de actividad enzimática residual dependen de la velocidad de crecimiento y del

tipo fisiológico de la bacteria presente (Wong P.C, 1994). Los tejidos animales retienen una proporción de su actividad enzimática original durante un considerable período de tiempo (hasta de una semana post-mortem), dependiente de la temperatura y del procesado. En el músculo en pre-rigor, el potencial redox permanece demasiado alto para el crecimiento de anaerobios durante unas seis horas, si bien la longitud de este período varía según la reserva de oxígeno del músculo. Este periodo de alto potencial redox, en el que el pH también se acidifica hasta un nivel inhibitor, hace posible el enfriamiento de la carne hasta alcanzarse una temperatura segura ( $< 15^{\circ} \text{C}$ ) antes de que comience el crecimiento de las bacterias anaerobias (Wong P.C, 1994). Durante el almacenamiento el potencial redox de la carne baja a unos  $-200 \text{ mV}$ ; la rápida multiplicación de los anaerobios sólo comienza a ser posible cuando Eh ha caído por debajo de  $+40 \text{ mV}$ . Una vez completado el rigor mortis el potencial redox suele ser de aproximadamente  $0 \text{ mV}$  (Wong P.C, 1994). En las carnes frescas picadas que no están empaquetadas en forma compacta, el valor Eh suele ser de unos  $+200 \text{ mV}$  ya que el pequeño tamaño de partícula ( $< 3\text{-}4 \text{ mm}$  de diámetro) permite la rápida difusión del oxígeno. En la carne fresca saturada de oxígeno lista para la picadora el núcleo pierde el oxígeno en cuestión de horas; sin embargo, si el picadillo fresco no se empaqueta en forma compacta permanecerá saturado de oxígeno durante 1-2 días. En consecuencia, el potencial redox de las carnes procesadas se puede controlar mediante el empaquetado (Wong P.C, 1994).

En las carnes los compuestos químicos que contienen grupos  $-\text{SH}$  mantienen las condiciones reductoras mientras que en frutas, hortalizas y verduras el ácido ascórbico y los azúcares reductores tienen el mismo efecto (Wong P.C, 1994).

#### **2.4.1.4 Constitución nutritiva del alimento**

De igual forma que otros factores intrínsecos, las necesidades de nutrientes de un grupo dado de microorganismos pueden cambiar con las condiciones bajo las cuales se cultivan. Por ejemplo, algunos microorganismos

se vuelven más exigentes desde el punto de vista nutritivo a temperaturas de cultivo más elevadas o a valores de Aw más bajos (Reichert J.E, 2000).

Casi todos los alimentos proporcionan nutrientes suficientes para permitir el crecimiento de una gran variedad de microorganismos. Los principales nutrientes son, los carbohidratos, las proteínas, el agua, vitaminas, minerales, nutrientes nitrogenados, lípidos, etcétera (Reichert J.E, 2000).

Sin embargo, aunque rara vez limita el crecimiento, la disponibilidad de nutrientes en los alimentos influye en la selección de la asociación alterante y también afecta considerablemente a las reacciones metabólicas perceptibles sensorialmente que tienen lugar en los alimentos (Reichert J.E, 2000).

La incapacidad de un microorganismo para utilizar un componente mayoritario de un material alimenticio limitará su crecimiento y lo situará en desventaja competitiva comparado con aquellos que son capaces de utilizarlo. La concentración de nutrientes indispensables puede, hasta cierto punto, determinar la velocidad de crecimiento bacteriano (Reichert J.E, 2000).

#### **2.4.1.5 Constituyentes antimicrobianos**

Todos los alimentos en alguna fase fueron parte de organismos vivos, y como tales, a lo largo del curso de la evolución han sido dotados de medios con los cuales las infecciones microbianas potencialmente perjudiciales pueden ser evitadas o por lo menos limitadas.

Los mecanismos por los cuales se produce la acción antimicrobiana son los siguientes:

- El primero de estos medios es el tegumento, se trata de una barrera frente a la infección como por ejemplo la piel, la cáscara, la vaina o la corteza de un producto.
- La inhibición de la biosíntesis de ácidos nucleicos, de proteínas o de paredes celulares.
- Daño en la integridad de las membranas.
- Interfieren con una gran variedad de procesos metabólicos que resultan esenciales para los microorganismos.
- Disminución de la disponibilidad de los nutrientes clave.

Estos componentes son: inmunoproteínas, lisozima, avidina (clara de huevo), el ovomucoide y albúmina (huevo); en la leche, lacteínas; en los alimentos marinos, las iniminas (Reichert J.E, 2000).

## **2.4.2 Factores extrínsecos**

### **2.4.2.1 Temperatura**

La magnitud de la temperatura determina decisivamente la capacidad de multiplicación de los microorganismos, para que ésta se produzca, existen zonas térmicas mínima, óptima y máxima. Si imperan temperaturas óptimas, contaremos con la mayor tasa de multiplicación o con los mínimos tiempos de generación (tiempo que transcurre entre dos particiones celulares). Las máximas tasas productoras de microorganismos difieren entre cada una de las especies de microorganismos, el tiempo de generación con temperaturas óptimas es por ejemplo, para el caso de *Salmonella* o *E. coli* 20 minutos, mientras que para el *Clostridium* es de 8 minutos (Wong P.C, 1994).

La temperatura óptima de multiplicación se encuentra por lo general algunos grados por debajo de la temperatura máxima, aunque existen microorganismos capaces de adaptarse a temperaturas extremas ya que un mismo microorganismo puede multiplicarse desde los  $-10^{\circ}$  a  $80^{\circ}$  C, con diferentes tasas de multiplicación, pero con multiplicación (Wong P.C, 1994).

Los datos correspondientes a las zonas térmicas para clasificación de microorganismos varían bastante dependiendo de la bibliografía científica consultada ya que algunos gérmenes cuyo espectro de crecimiento es psicrótrofos (psicrotolerante) pero también pueden entrar en la clasificación de psicrófilos (Wong P.C, 1994).

Cuadro 1. Zonas térmicas para la multiplicación de microorganismos.

Grupos de gérmenes	Temperatura de multiplicación (° C)		
	Mínima	Óptima	Máxima
Psicrótrofos	-5 a 3	20 a 30	35 a 40
Mesófilos	5 a 10	30 a 40	45 a 47
Termófilos	10 a 15	40 a 50	65

Wong P.C, 1994

Existen otros grupos que se encuentran entre estas clasificaciones como los psicrófilos los cuales crecen a temperaturas de refrigeración e inclusive de congelación (2 a -10 ° C). Los psicrótrofos, no crecen pero si sobreviven a temperaturas de refrigeración y los termóduricos, que sobreviven a temperaturas de cocción (Alan H, 1989).

Entre las bacterias psicrótrofas se encuentran principalmente especies de *Pseudomona*, *Aeromona*, *Acinatobacter*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* componentes de la flora de la descomposición de los alimentos, aunque también provocan alteraciones en los alimentos durante la refrigeración, solo un escaso número de bacterias adoptan el comportamiento de psicrófilos (Alan H, 1989).

Las bandas térmicas requeridas para la multiplicación de la mayoría de las bacterias patógenas se hallan en la zona de los mesófilos. Los cuales si se refrigeran entre 5 y 10°C como en los refrigeradores caseros existe el peligro de multiplicación por este genero de microorganismos (Alan H, 1989).

Las bacterias termoduricas de importancia son sobre todo gérmenes esporulados que se multiplican a partir de los 10° C por lo que si un alimento es cocinado y refrigerado es difícil que se presenten estos microorganismos aunque se debe de tomar en cuenta que algunos microorganismos como *Bacillus* se multiplican a 7° C (Alan H, 1989).

La acción de la temperatura por debajo de la mínima interrumpe la partición celular de los microorganismos, pero no los inactiva ya que la mayoría de los gérmenes resisten la acción de las bajas temperaturas, esperando a que el alimento sea calentado para recuperar su capacidad de multiplicación, sin

embargo por los procesos de congelación y descongelación puede que algunos microorganismos se dañen en su estructura y mueran. Cuando al calentar los alimentos se sobrepasa la temperatura máxima de multiplicación se verán frenados en su crecimiento inactivándose por acción de la coagulación de proteínas por lo que indudablemente se deberán de tomar en cuenta los valores de temperatura. Las formas vegetativas son más termoestables, encontrando mayor resistencia a las bacterias Gram positivas que las negativas (Alan H, 1989).

Las células y esporas de las levaduras se inactivan con total seguridad mediante los procesos de cocción ya que no resisten temperaturas de 60°C, pueden llegar a sobrevivir a exposiciones cortas de 100°C si el calor es seco. Los virus pueden ser más resistentes al calor que las formas bacterianas vegetativas, pero a temperaturas de 70°C por 30 minutos es completamente seguro la destrucción de los virus (Alan H, 1989).

#### **2.4.2.2 Humedad relativa**

La humedad relativa es esencialmente una medida de la actividad de agua de la fase gaseosa. Cuando se almacenan alimentos que tienen una actividad de agua baja en una atmósfera de humedad relativa elevada, el agua pasará desde la fase gaseosa del alimento. Es posible que transcurra mucho tiempo para que la masa del alimento aumente su actividad de agua, pero puede haber una condensación en las superficies que origine zonas localizadas de elevada actividad de agua (Wong P.C, 1994). En estas zonas en las que los microorganismos, que han permanecidos viables pero no han sido capaces de crecer, pueden ahora germinar y crecer. Una vez que los microorganismos han empezado a crecer y son activos desde el punto de vista fisiológico, habitualmente producen agua como producto final de la respiración. Así aumentan la actividad de agua de su propio medio ambiente inmediato de modo que finalmente los microorganismos que necesitan una  $A_w$  elevada son capaces de crecer y alterar un alimento que en un principio era considerado estable en el aspecto microbiológico (Wong P.C, 1994).



Si se quiere conservar la frescura de los alimentos se debe tener entre 80 y 95% de humedad relativa en productos sujetos a congelación. Si no se aumenta se deshidrata el producto (Wong P.C, 1994).

#### **2.4.2.3 Presencia y concentración de gases en el ambiente**

El oxígeno constituye el 21% de la atmósfera terrestre y, en circunstancias normales, es el gas más importante que se halla en contacto con los alimentos. Su presencia y su influencia en el potencial redox son determinantes importantes de las asociaciones microbianas que se desarrollan y de su velocidad de crecimiento (Urbain W.M, 1999).

El efecto inhibitor del dióxido de carbono sobre el crecimiento microbiano se aplica en el envasado de alimentos en atmósfera modificada y es una consecuencia ventajosa de su uso a presiones elevadas en las aguas minerales carbónicas (Urbain W.M, 1999).

Una atmósfera controlada es aquella en la que se fijan unas presiones parciales de la mezcla de gases, esta presión permanece constante durante todo el tiempo. En una atmósfera modificada fijamos una presión pero luego ya no nos preocupamos por la constancia de esa presión (Urbain W.M, 1999).

#### **2.4.2.4 Influencia del CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>**

Unas exigencias de oxígeno para la multiplicación o para la persistencia en los distintos alimentos, se cuenta entre las causas de la presencia selectiva en éstos de gérmenes bromatológicamente importantes. La cantidad de oxígeno presente en los alimentos a disposición del metabolismo de los gérmenes no solo resulta influida decisivamente por los gases de la atmósfera y por la cuantía de O<sub>2</sub> disuelto en los alimentos, sino también por el llamado potencial de oxido-reducción (potencial redox) (Urbain W.M, 1999). La magnitud del potencial redox viene determinada por la capacidad de sustancias que integran el alimento para oxidar o reducir. El potencial de energía que se libera en la oxidación o se precisa para los procesos reductores pueden expresarse en milivoltios, expresado en mV (Urbain W.M, 1999). Cuando predominan las sustancias reductoras (v.gr., azúcares, aminoácidos con grupos

SH, antioxidantes como el ácido ascórbico), se crean unas buenas condiciones para los gérmenes anaerobios, aún cuando el alimento en cuestión este depositado en atmósfera normal. La presión parcial de oxígeno existente en el alimento no es capaz de modificar en corto plazo el potencial redox resultante de la composición química. En cambio, el potencial redox, varía de acuerdo con el pH y mediante el tratamiento del alimento, es decir, que se puede alterar bajo la influencia de procesos tecnológicos (Urbain W.M, 1999).

Entre los gérmenes aerobios cuyo metabolismo depende de presencia de oxígeno molecular, se cuentan sobre todo mohos, levaduras, la mayoría de los esporulados aerobios y las pseudomonas. Mohos y levaduras solo pueden prosperar en la superficie de los alimentos, en virtud de su elevada necesidad de O<sub>2</sub>. Los gérmenes esporulados aerobios y las pseudomonas pueden también utilizar el oxígeno molecular presente en los alimentos, especialmente disueltos en los líquidos de estos, por lo que estos microorganismos se multiplican ante todo en superficies, pero también en alimentos líquidos (v.gr., leche, salmuera) o a escasas profundidades (cerca de la superficie) en los alimentos sólidos (Urbain W.M, 1999). Los anaerobios obligados solo pueden multiplicarse en ausencia de O<sub>2</sub>; el oxígeno desarrolla acción toxica sobre las formas vegetativas. Sin embargo, la sensibilidad al oxígeno es variable. Así, las exigencias en lo referente a anaerobiosis del *Clostridium perfringens* y *Clostridium botulinum*, importantes en la higiene de los alimentos, son por ejemplo inferiores a las exhibidas por gérmenes no esporulados pertenecientes a la flora intestinal (Urbain W.M, 1999). Por consiguiente, también pueden crecer clostridios en las profundidades de los alimentos que no fueron envasados con cierre hermético. La mayoría de los gérmenes patógenos y de la putrefacción son en su crecimiento anaerobios facultativos, como sucede con micrococos, estafilococos, *Enterobacteriae* y algunos esporulados aerobios (entre ellos, *Bacillus cereus* y *Bacillus coagulans*). Estos gérmenes prefieren para su multiplicación condiciones aerobias, pero también pueden crecer en los alimentos en condiciones anaerobias (Urbain W.M, 1999).

Los gérmenes microaerófilos muestran ante otros microorganismos una marcada preferencia hacia las concentraciones bajas de oxígeno y altas

tensiones parciales de CO<sub>2</sub>. Entre ellos se cuentan *Lactobacillus* y el *Brochothrix thermosphacta*, capaces de multiplicarse, por ejemplo, en conservas de carne envasadas al vacío y constituir la flora dominante de la descomposición. Microaerófilos estrictos son el *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*. El aumento de la presencia de oxígeno en su entorno no solo detiene su crecimiento, sino que también motiva la muerte de los gérmenes en breve paso (Urbain W.M, 1999).

## **2.5 Control del deterioro de la carne fresca**

### **2.5.1 Métodos de conservación**

La conservación de los alimentos ha sido una constante e importante preocupación a lo largo de la historia. Algunos de los métodos de conservación, como el frío, la desecación, el salado, el ahumado y el calentamiento, tienen un origen remoto. La conservación de los productos alimenticios sigue siendo hoy en día de vital importancia, aunque la mayor parte de la población no sea consciente de ello. Los alimentos deben poseer la suficiente capacidad de conservación, como para soportar sin deterioro, el a veces muy largo, trayecto de distribución comercial que va desde los centros de producción hasta los de consumo. Además, hay que tener en cuenta, que muchos productos estacionales han de conservarse de alguna forma para poderseles ofrecer al consumidor fuera de temporada. La carne es un producto fácilmente deteriorable y sin los procesos de conservación sería imposible garantizar un suministro constante a la población. La conservación de la carne es, por esta razón, uno de los principales objetivos de la tecnología alimentaria (Prandl, O, 1997).

El objetivo de la conservación es impedir la acción de las causas internas y externas de deterioro, o al menos, crear las condiciones mínimas necesarias para reducir éste durante el periodo de tiempo que media entre la producción y el consumo del producto. Actualmente se sabe que el principio básico de la conservación de alimentos, se basa en la eliminación total o parcial de alguna de las reacciones deteriorantes o de pérdida de calidad que se pueden presentar.

El que estos procesos destruyan o simplemente inhiban a los microorganismos depende de la intensidad del efecto y de la sensibilidad de los gérmenes. Los microorganismos más lábiles se destruyen enseguida, mientras que los más resistentes únicamente ven reducidos su metabolismo y sus procesos de reproducción. Estos últimos reanudan plenamente su desarrollo una vez que cesa el efecto inhibitor y se reinstauran unas condiciones favorables para su desarrollo.

Las reacciones que provocan pérdida de calidad de un alimento se clasifican en 4 grupos: de tipo microbiológico, enzimático, químico y físico. Las consecuencias de la pérdida de calidad se ven reflejadas con la presencia de toxinas, microorganismos, reacciones de oxidación y rancidez y cambios de color y sabor, entre otros.

La conservación de los productos cárnicos se realiza siempre, exceptuando la esterilización por calor o por irradiación, combinando uno o varios métodos físicos con uno o varios métodos químicos. La combinación más frecuente es la que consiste en salar, curar, ahumar, calentar y refrigerar el producto. En algunos productos se complementa adicionalmente con un proceso más o menos intenso de deshidratación. Los derivados cárnicos que se consumen en estado crudo se someten generalmente a un tratamiento de salado y de curado y frecuentemente se ahuman y deshidratan (si se desecan poco es necesario mantenerlos en refrigeración). Algunos productos cárnicos de consumo en crudo se someten a una fermentación en la cual se forma una flora típica del producto que además contribuye a la conservación del mismo.

El procedimiento de conservación no solo destruye e inhibe la microbiota, sino que además modifica en mayor o menor medida el producto en sí. La refrigeración es el único método que no altera sustancialmente las propiedades del producto (siempre y cuando se realice adecuadamente). La congelación, por el contrario, produce determinadas alteraciones que conllevan una disminución de la capacidad de retención de agua de la carne. Estas alteraciones dependen en gran medida del método de congelación utilizado. Generalizando se puede decir que la refrigeración y la congelación correctamente aplicadas no modifican sustancialmente la carne (en

comparación con otros métodos). La desventaja que presenta la congelación y la refrigeración es que han de ser mantenidas, mientras que en los demás métodos se consigue la conservación durante o mediante el proceso de fabricación del producto. Los procedimientos basados en el calentamiento provocan la desnaturalización de las proteínas, la inactivación de enzimas y, en ocasiones, la pérdida de vitaminas. Los procedimientos de deshidratación implican una reducción de la proporción de agua, lo que se traduce en una mayor concentración de las sustancias disueltas en el jugo de la carne (sales, proteínas y otras sustancias nitrogenadas) y en una mayor cantidad relativa de materias sólidas. La consistencia se incrementa, pero el producto pierde jugosidad. La irradiación también puede provocar alteraciones en la carne, principalmente debido a la formación de radicales químicos que modifican el sabor. Por todos conocidos son los cambios de color, de estructura, de olor y de sabor que produce el curado en cualquier tipo de producto. El ahumado modifica principalmente y característicamente el aspecto externo de los productos, confiriéndoles un olor y sabor específico (Prandl, O, 1997).

Los llamados métodos de conservación química, que están basados en la utilización de determinados conservadores químicos, actúan inhibiendo y destruyendo los microorganismos sin apenas modificar los productos. El inconveniente de los conservadores químicos es que el consumidor los ingiere junto con el producto alimenticio.

Los ejemplos citados bastan para evidenciar el hecho de que la conservación suele implicar una modificación del producto cárnico, modificación que puede ser positiva o negativa. Las modificaciones positivas explican por qué en ocasiones se aplican estos métodos a unos productos que no los necesitan para su conservación, por ejemplo, la adición de sales curantes y de condensados de humo a determinadas conservas.

Es por ello, que la búsqueda de procedimientos de conservación mejorados se enfoca hacia tecnologías en las que se combinen varios factores, algunos de ellos más recientes como el uso de antimicrobianos naturales, altas presiones, atmósferas modificadas y/o atmósferas controladas, películas comestibles, uso de flora competitiva, empaquetado al vacío, pulsos eléctricos,

ultrasonido y pulsos de luz, cada uno de ellos en combinación con los factores tradicionales de conservación, ambos en dosis bajas con el fin de mejorar enormemente la calidad del producto asemejándolo a un producto fresco, además de minimizar los costos energéticos durante el almacenamiento. Es evidente que un producto cárnico es un buen medio de crecimiento para microorganismos y por ello representan un riesgo potencial, ya que los tipos y niveles de células que se presenten en un alimento serán afectados por la microflora original, los microorganismos contaminantes antes y después del procesamiento, los efectos del proceso y empaçado, las propiedades intrínsecas del alimento ( $A_w$ , pH, tipo de ácido, antimicrobianos, nutrientes,  $O_2$ , potencial redox, componentes, etc.) y los factores extrínsecos aplicados como la humedad relativa, temperatura y presencia de luz durante el almacenamiento.

### **2.5.2 Empacado al Vacío**

Muchos productos cárnicos curados o incluso crudos se fabrican en grandes establecimientos, siendo con frecuencia ofertados durante largo tiempo en centros comerciales filiales ubicados a grandes distancias. Para proteger a estos artículos se ha difundido el envasado al vacío de los mismos.

El empaçado se realiza fundamentalmente para proteger a la carne o sus derivados de contaminaciones durante los procesos de manipulación, transporte, etc. El empaque no es un método de conservación en sí mismo, sino que el empaque acompaña a los diversos métodos como un mecanismo de mejorar la eficacia de la conservación. Empacar no va a mejorar la calidad del producto sino que simplemente la mantiene. El empaçado al vacío extiende la vida de anaquel, elimina la pérdida por deshidratación, elimina la quemadura de la congelación, y favorece la apariencia del producto envasado (Urbain W.M, 1999).

El empaçado al vacío consiste en la extracción del aire del envase, seguido de un sellado que hace que el aire no pueda penetrar. La atmósfera dentro de los paquetes de carne fresca al vacío cambia en pocas horas después del empaçado (Urbain W.M, 1999). Los bajos niveles de oxígeno en

las capas superficiales resultan en la formación de metamioglobina. Sin embargo, todos los pigmentos son gradualmente cambiados al color púrpura de la mioglobina reducida, puesto que las enzimas respiratorias del músculo y de los microorganismos utilizan el resto de oxígeno (Urbain W.M, 1999). Esta actividad respiratoria resulta en la formación de dióxido de carbono y en una bajada de pH de la formación de ácido carbónico. Las bacterias anaerobias facultativas pueden comenzar a crecer y producir ácido láctico también. El bajo pH y la ausencia de oxígeno inhiben el crecimiento de bacterias y extienden la vida de anaquel significativamente hasta unas 3 semanas. Sin embargo, si la carne que estaba muy contaminada puede tener descomposición de pigmentos, decoloración y olores extraños del crecimiento de bacterias anaeróbicas.

El color púrpura de la carne empacada al vacío representa un problema para la venta. Algunos consumidores asocian el color oscuro a la falta de frescura, sin embargo, como se ha señalado la calidad es mayor que cuando se utilizan empaques que permiten el paso de oxígeno. Después de abrir el empaque, el color rojo de la carne se recupera (Urbain W.M, 1999).

### **2.5.3 Empacado en Atmósferas Modificadas y Controladas**

Proceso por el cual una mezcla de gases de composición definida se introduce en un empaque impermeable al gas que contiene el producto o bien se inyecta en el paquete que lleva películas altamente permeables al gas e impermeables a la humedad, tales como el PVC (Urbain W.M, 1999). Los gases que normalmente se utilizan son:

1. Dioxido de Carbono – que limita el crecimiento microbiano
2. Nitrógeno
3. Oxígeno- que estabiliza el color, pero que favorece el crecimiento microbiano

Ventajas de las atmósferas modificadas

- a. No compacta el producto
- b. Se puede usar para mantener un color a carne fresca.

Desventajas de las atmósferas modificadas

- a. Difícil de monitorear pues un paquete de carne no es un sistema estable.
  - 1. El metabolismo celular continua, las mitocondrias absorben oxígeno y producen dióxido de carbono.
  - 2. Los microorganismos siguen consumiendo oxígeno y lo convierten en dióxido de carbono.
  - 3. Las fugas son difíciles de detectar
  - 4. Normalmente no incrementan la vida de anaquel.
  - 5. Los paquetes deben ser muy grandes para que les quepa el gas.

#### Combinaciones típicas de gases

- a. Introducir 20% CO<sub>2</sub> (para inhibir crecimiento de bacterias alterantes) y 80% O<sub>2</sub> (para el desarrollo y mantenimiento del color) directamente al paquete con el uso de un material impermeable ha sido efectivo en aumentar la vida de anaquel de carne fresca y mantener su color.
- b. Otra mezcla 60% O<sub>2</sub> en la mezcla para tener buen color
- c. También se usa nitrógeno como una tercera opción en las combinaciones. Si se utiliza 100% de nitrógeno el color de la carne se convierte en café. Una combinación de 20% oxígeno y 80% nitrógeno resultó ser igual o mayor que un empaque al vacío en lo que se refiere a vida media (Urbain W.M, 1999).

#### **2.5.4 Alteración de la carne envasada al vacío (Vida de Anaquel)**

El uso de envases al vacío o en atmósferas modificadas favorece el crecimiento de anaerobios facultativos y anaerobios verdaderos. Los géneros bacterianos encontrados en estos ambientes incluyen *Brochothrix*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, y miembros de *Enterobacteriaceae*. La descomposición de la carne cocinada al vacío puede ser debida a mesófilos aerobios y anaerobios formadores de esporas, como los géneros *Bacillus* y *Clostridium* respectivamente. Específicamente aquellos que pudren la carne cocinada son *C. putrefaciens* que puede crecer a de 0 a 30°C (Won, 2001).



El crecimiento de los microorganismos de las carnes frescas envasadas a vacío, almacenadas a 3-5°C, se retrasa observándose corrientemente un período de latencia de 3 a 5 días. El crecimiento subsiguiente es lento y continúa aproximadamente 10 días, transcurridos los cuales el recuento total viene a ser de 10<sup>7</sup> microorganismos/cm<sup>2</sup> (o por g en la carne molida); esto supone aproximadamente el 1% del alcanzado en películas permeables. Cualitativamente la flora microbiana del envase impermeable está dominada por las bacterias lácticas (sobre todo lactobacilos y *Leuconostoc*) que al final del almacenamiento representan el 50-90% de la flora total. Esto refleja su característica resistencia al acumulo de dióxido de carbono y su capacidad de crecer en condiciones anaerobias; las pseudomonas no se desarrollan en presencia de dióxido de carbono ni en ausencia de oxígeno. Por ejemplo, *Lactobacillus viridescens* produce pigmentos verdosos en productos cárnicos (Won, 2001).

Las bacterias lácticas atacan preferentemente a los carbohidratos, pero debido a la escasa concentración de éstos en la carne, es relativamente poco el ácido formado y en consecuencia la caída del pH no es muy marcada. Esto significa que incluso cuando es máxima la densidad de estos microorganismos la alteración observada es poco manifiesta; se asocia a olores amargos o quesoso debido a la formación de ácidos grasos, entre los que sobre salen el acético y el butírico (Won, 2001).

Al aumentar la permeabilidad de la película del envase, la flora alterativa cambia gradualmente a otra formada por una gran proporción de pseudomonas; por lo tanto los cambios alterativos son los típicos de la carne fresca sin envasar (Won, 2001).

### **2.5.5 Métodos para alargar la vida de anaquel en productos cárnicos empacados al vacío**

#### **Biopreservación**

Existen estudios sobre la utilización de cultivos bioprotectores en productos cárnicos envasados al vacío. Kotzidou y Bloukas (1996) demostraron que la vida útil de jamón cocido loncheado podía alargarse una

semana cuando era inoculado con el cultivo bioprotector *Lactobacillus alimentarius*, sin embargo la misma cepa no consiguió evitar la producción de viscosidad en salchichas de frankfurt inoculadas con cepas productoras de limo (Bjorkroth y Korkeala, 1997). Entre un número importante de lactobacilos psicrótrofos homofermentativos aislados de carne en atmósfera modificada *L. Alimentarius* Bj-J-33 fue seleccionado y comercializado como un cultivo puro seco-congelado con el nombre de FloraCarn L-2 (Andersen, L, 1995). Las características de Flora Carn L-2 para biopreservación de productos cárnicos envasados al vacío o en atmósferas modificadas son que no produce gas y que es capaz de crecer a 2°C. Por lo tanto el cultivo es competitivo con la flora psicrótrofa que normalmente domina los productos cárnicos refrigerados. FloraCarn L-2 fermenta la glucosa y sacarosa, pero solo produce una pequeña cantidad de ácido láctico. Además, la limitada capacidad proteolítica y lipolítica de FloraCarn L-2 asegura que las propiedades sensoriales del producto cárnico no serán afectadas. El cultivo no produce peróxido de hidrogeno ni bacteriocinas. FloraCarn L-2 debe ser añadido a los productos cocinados después del tratamiento térmico, por ejemplo introduciendo la carne en una solución de FloraCarn L-2 o por aspersión sobre la superficie o en el paquete justo antes del sellado. La acción de FloraCarn L-2 se ejerce sobre patógenos (*L. monocytogenes*, *Staph. aureus*), flora Gram negativa y bacterias ácido lácticas productoras de gas y *Brochothrix* (Jelle, 1987, 1991).

Existen otros biopreservadores como *L. sakei* CTC494 y *Enterococcus faecium* CTC492, que son bacterias lácticas cuya actividad antilisteria ha sido ampliamente demostrada, tanto en carne fresca como en productos cárnicos cocidos o fermentados (Hugas y col., 1995, 1998). Garriga y col., 2001, mostraron resultados que confirman la eficiencia de dichas bacterias como cultivos protectores, consiguiendo alargar la vida útil del producto mediante la prevención de la viscosidad por parte de *L. sakei* CTC746.

#### Bacteriocinas (Nisina)

Las bacteriocinas utilizadas para prevenir el deterioro de carnes empacadas al vacío son entre otras, la sakacin A y la sakacin 674 aisladas de

*Lactobacillus sake* Lb706 y Lb674 respectivamente. Estas bacteriocinas controlaron el crecimiento de *L. monocytogenes* en embutidos Bruehwurst (Kroeckel and Schmidt, 1994).

## **2.6 Bacterias lácticas y sus metabolitos**

Los probióticos son microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades adecuadas ejercen una influencia positiva en la salud o en la fisiología del hospedero (Schrezenmeir, J, 2001). La forma mas frecuente de consumir probióticos es a través de alimentos lácteos que contienen especies intestinales de lactobacilos y bifidobacterias; por los efectos benéficos adicionales a los nutritivos, estos alimentos se consideran en el grupo de los alimentos funcionales (Palou A, 2000).

Una vez que los probióticos son ingeridos ocurren cambios en la microflora intestinal que repercuten positivamente en el estado de salud del consumidor. Es importante resaltar que la flora intestinal es una comunidad interactiva de organismos con funciones específicas para mantener el estado de salud. Esta función es la suma resultante de las diferentes actividades combinadas de los organismos que la conforman como lo son la fermentación de sustratos de la dieta no digeribles y del moco producido por el epitelio con la producción de ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato) favoreciendo la recuperación y la absorción de calcio, hierro y magnesio, en la regulación del metabolismo de la glucosa reduciendo la glicemia postprandial, así como, la síntesis de la vitamina K y de las del grupo B (Guarner F. 2000). Algunos beneficios incluyen mejoría en las enfermedades infecciosas, enfermedades crónicas intestinales como colitis ulcerosa, inmunomodulación, biodisponibilidad de nutrientes, enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus no insulino dependiente, obesidad, osteoporosis y cáncer (Marteau P, 2001, Sanders ME. 2000, Saavedra JM. 2001). Estos efectos pueden deberse directa o indirectamente a la regulación de la microflora intestinal o de la respuesta inmunológica (Guarner F, 2002). Entre las bacterias probióticas mas utilizadas para el consumo humano se encuentran las llamadas bacterias ácido lácticas (BAL), que incluyen a las siguientes: *Lactobacillus acidophilus*, *L.*

*plantarum*, *L. casei*, *L. casei* spp *ramnosus*, *L. delbrueckii* spp *bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *Lactococcus lactis* spp *lactis*, *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. breve*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, entre otros (Farnworth ER. 2001 )

Una forma de actuar de los probióticos para lograr alcanzar un buen estado de salud del individuo, es a través de la resistencia otorgada contra la invasión de microorganismos patógenos, que se logra mediante la generación de sustancias antimicrobianas como ácido láctico y otros ácidos de cadena corta, metabolitos como peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas (Mateos JA. 2002).

Las BAL han estado presentes en la alimentación del hombre desde hace siglos ya que se encuentran en productos de leches fermentadas como yogurt, jocoque, quesos madurados, productos cárnicos y hasta en algunas hortalizas. Metchnikoff hace mas de un siglo comprobó el efecto benéfico en la salud por el consumo de leches fermentadas (Mateos JA. 2002).

Además de que las BAL proporcionan sabor y textura e incrementan el valor nutricional de los alimentos, desde hace décadas se utilizan en la industria alimenticia como bioconservadores debido a la producción de bacteriocinas y otras sustancias que ejercen acción antibacteriana que contribuyen a la prevención de la descomposición de los alimentos (Campos, JA. 2002).

La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas representa un gran potencial para la industria alimenticia ya que se pueden utilizar como conservadores biológicos puros que en un momento dado podrían reemplazar a los conservadores químicos ya que tienen la ventaja de ser proteínas que al biodegradarse no forman compuestos secundarios.

Existen numerosas bacteriocinas producidas por las BAL y cada una tiene espectros de inhibición particulares, esta característica es aprovechada en la industria de los alimentos para utilizarlas de diversas formas. Algunas bacteriocinas se utilizan en procesos que requieren la inhibición del crecimiento de bacterias indeseables específicas estrechamente relacionadas al productor

de la bacteriocina, y en otros casos se aplican para inhibir el crecimiento de microorganismos degradadores de alimentos o de patógenos como estafilococos y listerias, respectivamente. (Stiles ME. 1996)

### 2.6.1 Clasificación

Tradicionalmente se considera a las bacteriocinas como péptidos biológicamente activos que tienen propiedades bactericidas contra otras especies estrechamente relacionadas con la cepa productora, sin embargo, recientemente este concepto se ha modificado ya que se han encontrado también acciones bactericidas contra cepas distanciadas filogenéticamente de la cepa productora (Sablon E, B, 2000).

Diversos investigadores han buscado clasificar a las bacteriocina de acuerdo a sus características bioquímicas y genética (Klenhamer TR 1993, Nes IF, 1996). A continuación se presenta la clasificación de estos compuestos propuesta por Ness en 1996 en base a las características bioquímicas y genéticas:

- Clase I.- Lantibióticos.- Son péptidos pequeños activos a nivel de membrana y que contienen algunos aminoácidos poco comunes como lantionina, b-metil-lantionina y dihidroalanina que se forman debido a modificaciones posteriores al proceso de la traducción. La formación de aminoácidos no comunes se explica por la deshidratación de los aminoácidos serina y treonina, con la posterior adición de los átomos de azufre de la cisteína a los dobles enlaces de los deshidroaminoácidos. Un ejemplo bien conocido de este tipo de bacteriocinas es la nisina.
- Clase II.- No lantibióticos.- Son bacteriocinas de peso molecular variable, que contienen aminoácidos regulares. En este grupo se pueden identificar tres subclases:
  - Clase IIa.- Son péptidos activos contra *Listeria*, tienen la secuencia consenso en la región N-terminal TGNGVXC y sus representantes característicos son la pediocina PA-1 y la sakacina P.
  - Clase IIb.- Son formadores de complejos de poración que consisten de dos péptidos diferentes. Ambos péptidos son necesarios para una mejor

actividad antimicrobiana. En este grupo se encuentran la lactococcina G y las plantaricinas EF y JK.

- Clase IIc.- péptidos pequeños, termoestables, no modificados y que se transportan mediante péptidos líder. En esta subclase solamente se reportan las bacteriocinas divergicina A y acidocina B.
- Clase III.- Son péptidos grandes mayores de 30 kDa, en esta clase se encuentran las helveticinas J y V, acidofilicina A, lactacinas A y B (Delves-Broughton J. 1990).

Cotter y col. (2005), sugirieron una modificación a esta clasificación en donde quedan agrupadas las bacteriocinas en dos grupos mayoritarios: los lantibióticos que contienen lantionina (clase I) y los que no contienen lantionina (clase II), mientras que las bacteriocinas de alto peso molecular y termolabiles (clase III) quedan agrupadas bajo la designación de “bacteriolisinas”. Con respecto a la antigua clase IV, los autores no la incluyen dentro de esta clasificación debido a que ninguno de los miembros de este grupo ha sido suficientemente caracterizado como para demostrar su existencia.

Cuadro 2. Clasificación de bacteriocinas

Clase	Subclase	Características	Descripción	Ejemplos
Clase I		Bacteriocinas con lantionina	Lantibióticos de uno y dos péptidos.	Péptido sencillo: nisina, mersacidina, lacticina 481.
				Péptido doble: lacticina 3147, citolisina.
II	Ila	Bacteriocinas sin lantionina, pequeños péptidos heterogéneos.	Bacteriocinas tipo pediocina	Pediocina PA1, leucocina A.
	Iib		Bacteriocinas de dos péptidos.	Lactacina F
	Iic		Bacteriocinas cíclicas	Enterocina AS48, reuterina 6.
	Iid		Bacteriocinas de un solo péptido y lineales.	Lactococcina A, divergicina A.
Bacteriolisinas		Proteínas líticas, no bacteriocinas.	Son grandes proteínas termolabiles.	Lisostafina, enterolisina A.

Cotter y col., 2005.

Más recientemente, Heng y Tagg (2006) propusieron una nueva clasificación de bacteriocinas, en la que respetan la agrupación de Cotter y col. (2005) con respecto a la clase I y II, pero a la clase III la dividen en dos tipos: IIIa bacteriolíticas y IIIb no líticas, y la clase IIc ahora es agrupada como la clase IV para péptidos cíclicos.

### **2.6.2 Acido láctico**

El ácido láctico ( $\text{CH}_3\text{-HCOH-COOH}$ ) es un ácido orgánico con un sabor levemente ácido. Es óptimamente activo y puede estar presente en la forma L(+), la forma D(-) (conocida como ácido sarcoláctico) o como una mezcla en la forma DL (Delves-Broughton J. 1990).

El ácido láctico puede ser producido bacterialmente por medio de bacterias gram-positivas morfológicamente no uniformes. Dentro de estas bacterias esta la familia *Lactobacillaceae* con los géneros *Lactobacillus* (reconocibles bajo el microscopio como varillas largas o cortas). Las bacterias ácido lácticas con forma de cocos pertenecen principalmente a los generos *Aerococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*. Las bacterias bífidas pueden también producir ácido láctico (Familia *Actinomycetaceae*, género *Bifidobacterium*; Familia *Bacillaceae*, genero *sporolactobacillus*) (Delves-Broughton J. 1990).

Las bacterias ácido lácticas son divididas en grupo homofermentativo y grupo heterofermentativo. Las especies homofermentativas rompen la glucosa a través de la ruta de la fructosa difosfato (glicólisis) casi exclusivamente a ácido láctico. Las bacterias ácido lácticas heterofermentativas rompen la glucosa a través de la ruta de la pentosa fosfato. Los productos finales, además del ácido láctico, son el ácido acético, el dióxido de carbono y el etanol (Delves-Broughton J. 1990).

### **2.6.3 Ácido acético**

El ácido acético ( $\text{CH}_3\text{-COOH}$ ) es un ácido orgánico con un sabor y olor muy fuerte, este puede ser producido por medio de las bacterias ácido lácticas heterofermentativas. Siendo posible aquí dos rutas metabólicas.

El ácido acético puede ser producido si se adiciona al proceso gluconolactona. El *L. Plantarum* y el *L. Sake* rompen el ácido glucónico en ácido acético (Delves-Broughton J. 1990).

#### **2.6.4 Dióxido de carbono**

El dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) es un gas incoloro e insaboro. Cuando se disuelve en agua se produce ácido carbónico (inestable).

El dióxido de carbono puede producirse por medio de las bacterias ácido lácticas heterofermentativas a través de dos rutas metabólicas (Delves-Broughton J. 1990).

Ha sido hallado que el dióxido de carbono tiene un efecto antibacteriano. En particular las bacterias aeróbicas Gram-negativas, caso de *Pseudomonas*, son inhibidas por medio del dióxido de carbono. El dióxido de carbono es usado en técnicas de atmósferas modificadas para carne fresca en cortes y otros alimentos (Delves-Broughton J. 1990).

#### **2.6.5 Diacetilo**

El diacetilo (CH<sub>3</sub>-CO-CO-CH<sub>3</sub>) y la acetoina (CH<sub>3</sub>-CO-CHOH-CH<sub>3</sub>), a diferencia de los productos metabólicos mencionados antes, son productos de la fermentación no ácidos. El diacetilo es familiar a partir del aroma de la mantequilla. Está involucrado en el perfil del olor y sabor de los productos lácteos fermentados. Los cultivos iniciadores usados en elaboración de productos lácteos influyen el desarrollo del aroma en forma positiva a través de la producción de diacetilo (Daeschel, 1989).

El diacetilo también tiene un efecto antibacterial. Las levaduras y bacterias gram-negativas y gram-positivas son inhibidas por medio del diacetilo. Es importante mencionar que las bacterias ácido lácticas (gram-positivas) no son inhibidas o son inhibidas solo a mucho mas altas concentraciones que otros organismos (Daeschel, 1989).

Producción de diacetilo



### **2.6.6 Reuterina**

Finalmente se debe mencionar un producto metabólico producido por las especies heterofermentativas *Lactobacillus reuterii* y llamado reuterina. Este es un compuesto de bajo peso molecular que tiene un amplio efecto antibacterial (Daeschel, 1989). Se ha reportado que son inhibidas especies de *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida* y tripanosoma. Se ha sugerido que la reuterina o los lactobacilli productores de reuterina pueden ser usados para conservar alimentos y piensos para animales. La acción inhibitoria del reuterina ha sido demostrada en carne molida (Daeschel, 1989).

### **2.6.7 Modo de acción (Bacteriocinas)**

El modo de acción de las bacteriocinas es complejo. La nisina en la clase I y la pediocina como representante de la clase II, son las más estudiadas en este concepto y comparten algunas características en común. Por lo general, actúan destruyendo la integridad de la membrana citoplasmática a través de la formación de poros, lo que provoca la salida de compuestos pequeños o altera la fuerza motriz de protones necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas o ácido nucleico (Daeschel, 1989).

Es posible que las clases I y II de las bacteriocinas compartan mecanismos de acción semejantes. Al parecer, los péptidos se unen a la membrana citoplasmática a través de uniones electrostáticas con los fosfolípidos cargados negativamente, luego se insertan a la membrana con una reorientación que depende del potencial de membrana, el cual está influenciado por el pH y la composición fosfolipídica. Los monómeros de bacteriocina forman agregados proteicos que resultan en la formación del poro con la consecuente salida de iones (principalmente potasio y magnesio), pérdida de la fuerza motriz de protones (FMP), salida de ATP y aminoácidos. La fuerza motriz de protones juega un papel central en la síntesis de ATP, en el transporte activo y el movimiento bacteriano, por lo tanto, se inhibe la síntesis de macromoléculas y la producción de energía dando como resultado la muerte celular (Daeschel, 1989).

Las bacteriocinas se pueden agrupar con base en su estructura, pero también con base en su modo de acción. Algunos miembros de la clase I (lantibióticos), como la nisina, han demostrado tener un modo dual de acción: pueden unirse al lípido II (receptor universal y principal transportador de subunidades de peptidoglicano del citoplasma a la pared celular) impidiendo la síntesis correcta de la pared celular y conduciendo a la célula a la muerte. Además, puede utilizar al lípido II e interaccionar con la bacteriocina para iniciar un proceso de inserción en la membrana y formación de poros, que conducen a la muerte rápida de la célula. Lantibióticos con dos péptidos (como la lacticina 3147) pueden tener esta actividad dual distribuida en los dos péptidos (Cotter y col., 2005).

En general, los péptidos de la clase II tienen una estructura anfifílica helicoidal la cual permite que se inserte en la membrana de las células blanco, conduciendo a la despolarización y muerte (Cotter y col., 2005). El extremo hidrofílico amino terminal de las moléculas es la parte donde se da la interacción inicial con las cabezas de los fosfolípidos aniónicos de la membrana. El extremo C terminal de la molécula, que es más hidrofóbico que el amino, se cree que tiene relación con las interacciones hidrofóbicas con la membrana.

Las grandes proteínas bacteriolíticas (bacteriolisinas o clase III de las bacteriocinas) como la lisostafina, pueden funcionar directamente en la pared celular de blancos gram positivos, conduciendo a la muerte y lisis de la célula (Cotter y col., 2005).

## **2.6.8 Bacteriocinas representativas**

### **2.6.8.1 Nisina**

La Nisina, descrita en 1928, fue la primer bacteriocina aislada a partir de la bacteria ácido láctica *Lactococcus lactis* subespecie *lactis*. Es la bacteriocina mejor caracterizada y es utilizada como conservador de alimentos; es la única reconocida por la FDA con la categoría GRAS (Generally Recognized As Safe). Se produce de forma natural en algunos productos lácteos y se utiliza en la producción de alimentos como un aditivo en productos lácteos para prevenir la

descomposición ocasionada por bacterias Gram positivas, especialmente de los géneros *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Listeria* (Daeschel, 1989).

Es un péptido de 34 aminoácidos, de bajo peso molecular menor a 5 kDa. La síntesis de la nisina es compleja, requiere de procesos de transcripción, traducción, modificaciones post-traduccionales, secreción, procesamiento, y señales de transducción. Existen dos variantes de esta bacteriocina, la nisina A y la nisina Z, que difieren solamente en el aminoácido de la posición 27, la histidina en la nisina A cambia por asparagina en la nisina Z (Daeschel, 1989).

En la síntesis de la nisina participan un grupo de genes ordenados como *nisABTCIP*, *nisRK*, y *nisFEG* que regulan la expresión del gen estructural *nisA*. El precursor inactivo NisA es modificado químicamente por los productos de *nisB* y *nisC* que deshidratan a los residuos de treonina y serina y originan la formación de los enlaces tioeter característicos de los lantibióticos. Una vez modificado el precursor, este es transportado, procesado y secretado; Para proteger a la célula productora, existen las proteínas NisI y NisFEG que le confieren inmunidad (Daeschel, 1989).

#### **2.6.8.2 Pediocina**

Es una bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* y es utilizada como conservador en productos vegetales y cárnicos y se ha observado una elevada actividad contra especies de *Listeria* (Daeschel, 1989).

La pediocina es sintetizada como un pre-péptido de 62 aminoácidos que al ser procesado resulta en un péptido maduro de 44 residuos, anfifílico, con carga positiva y regiones altamente hidrofóbicas y con 2 enlaces disulfuro. La estructura terciaria de la pediocina PA-1 ya ha sido determinada, en el extremo N-terminal contiene 3 láminas que originan una conformación de horquilla, en cambio en el extremo C-terminal se presenta un alto grado de libertad conformacional a excepción de un enlace disulfuro entre los aminoácidos 24 y 44, que es esencial para su actividad (Daeschel, 1989).

Para la síntesis de la pediocina se ha descrito la participación de un grupo de genes. El gen *pedA* es el gen estructural, el gen *pedB* se requiere

para la inmunidad y los genes *pedC* y *pedD* participan en la secreción del péptido maduro (Daeschel, 1989).

Dada su alta actividad contra especies de *Listeria* esta bacteriocina tiene un alto potencial para ser utilizado como conservador en alimentos lácteos (Daeschel, 1989).

#### **2.6.8.3 Plantaricinas E/F y J/K**

Son bacteriocinas del grupo IIb producidas por *Lactobacillus plantarum* que tienen actividad antimicrobiana cuando interactúan como un sistema de 2 péptidos. La síntesis de la plantaricina es sumamente compleja, esta regulada por la acción de 5 operones con 21 genes diferentes (Daeschel, 1989). Los péptidos activos para la formación de poros en la membrana citoplasmática de las células blanco son PlnE y PlnF que conforman la plantaricina E/F y los péptidos PlnJ y PlnK constituyen la plantaricina J/K. Se ha encontrado que esos 4 péptidos catiónicos poseen de 25 a 34 aminoácidos y tienen actividad bactericida de manera independiente, la cual se potencia cuando se interactúan en pares formando los complejos de poración E/F y J/K (Daeschel, 1989). Los poros formados presentan diferente selectividad iónica, ya que la plantaricina E/F permite el paso de cationes monovalentes en contraste con la plantaricina J/K que es selectiva para compuestos aniónicos. Esta actividad complementaria combinada de E/F y J/K garantizan una eficiente actividad bactericida (Daeschel, 1989).

#### **2.6.8.4 Divergicina A**

Es una bacteriocina producida por *Caernobacterium divergens* LV13 que se caracteriza por poseer un sistema de secreción que involucra la presencia de un péptido señal. El gen estructural *dvnA* codifica para un prepéptido de 75 aminoácidos que tiene una región N-terminal de 29 aminoácidos y un péptido maduro de 46 aminoácidos (Daeschel, 1989). Con un peso molecular de 4.6 kDa, la divergicina A es un péptido pequeño, de naturaleza hidrofóbica y termoestable. A diferencia de las bacteriocinas de la clase II que tienen un sitio de rompimiento característico Gli-Gli, esta bacteriocina posee en su extremo N-

terminal un sitio de rompimiento Ala-Ser-Ala y actúa como péptido señal para el uso del sistema de secreción de la célula (Daeschel, 1989). Cabe destacar que al generarse el péptido señal a partir del mismo gen estructural, resulta innecesaria la presencia de genes que produzcan proteínas necesarias para el procesamiento y secreción de la bacteriocina madura (Daeschel, 1989).

#### **2.6.8.5 Helveticina J**

Esta bacteriocina es producida por *Lactobacillus helveticus*, microorganismo que se encuentra de manera natural en quesos madurados. La bacteriocina presenta actividad antibacterial contra especies relacionadas. Es una proteína de 37 kDa termolábil (30 min a 100°C) y el gen que la produce se localiza en el ADN cromosomal (Daeschel, 1989). Poco se conoce de las características bioquímicas de la bacteriocina y de su modo de acción.

### **2.7 Ácidos orgánicos**

Los ácidos orgánicos y sus ésteres se hallan muy difundidos en la naturaleza. Se encuentran con frecuencia en frutas; por ejemplo, el ácido cítrico de los frutos cítricos, el ácido benzoico en arándanos agrios y las ciruelas verdes, el ácido sórbico en la fruta del fresno. El ácido láctico se encuentra en los tejidos animales; el galato de metilo en las hojas de diversos géneros de plantas; en las especias se encuentran varios ácidos orgánicos. Muchos de ellos constituyen metabolitos intermediarios y productos finales del metabolismo microbiano y se encuentran en grandes cantidades en muchos productos lácticos, cárnicos y vegetales fermentados. Nuestros antepasados descubrieron que los cambios deseables desarrollados sobre el aroma y la textura de estos productos y la acidez provocada por la formación de ácidos orgánicos constituía un medio valioso para retrasar o evitar la alteración proteolítica. Ello permitió conservar almacenados muchos alimentos perecederos y hacer la dieta más variada. Hoy en día muchos fabricantes utilizan ciertos ácidos orgánicos para ayudar a la conservación de diversos productos. Sin embargo, la concentración y el tipo de ácidos orgánicos permitida son cuidadosamente controlados por los organismos

gubernamentales responsables de la Sanidad, y las concentraciones permitidas son generalmente pequeñas, comparadas con las de los ácidos orgánicos en muchas frutas y productos fermentados.

Por su solubilidad, sabor y baja toxicidad los ácidos orgánicos de cadena corta, como el acético, benzoico, cítrico, propiónico, y sórbico son muy utilizados como conservadores o acidificantes. Al considerar la posible utilización como conservadores de otros ácidos orgánicos conviene recordar que la actividad antimicrobiana de estos compuestos suele ser superior a medida que se alarga la longitud de su cadena molecular. Sin embargo, los ácidos alifáticos de más de diez u once átomos de carbono poseen muy poca aplicación potencial debido a su muy baja solubilidad en agua.

La actividad antimicrobiana de un ácido orgánico o su éster se debe a las moléculas no disociadas del compuesto. Algunos ácidos orgánicos en su estado no disociado son muy solubles en las membranas celulares. Únicamente los ácidos orgánicos, lipófilos muestran actividad antimicrobiana. Según una hipótesis, estos compuestos inhiben el crecimiento de los microorganismos, o los matan, por interferir con la permeabilidad de la membrana celular al producir un desacoplamiento en el transporte de sustratos y en la fosforilación oxidativa del sistema transportador de electrones. Los ácidos orgánicos saturados, como el ácido sórbico y los ésteres del ácido parahidroxibenzoico, también inhiben el sistema de transporte de electrones. Este fenómeno da lugar a la acidificación del contenido celular, que es probablemente la principal causa de la inhibición y muerte de los microorganismos. El pKa (pKa igual al pH en el cual el 50 % del ácido se halla no disociado) de los ácidos orgánicos empleados como conservadores se halla en el rango de pH de 3-5. Al bajar el pH de un alimento, aumenta la proporción de las moléculas no disociadas de un determinado ácido orgánico, aumentando de esta forma su efectividad como agente antimicrobiano. Estas consideraciones limitan la utilidad de los ácidos orgánicos a aquellos alimentos de pH inferior a 5.5. Los ácidos orgánicos se utilizan principalmente como agentes micostáticos. Sin embargo, a concentraciones elevadas, son muy eficaces frente a diversos microorganismos (incluidos los virus) La mayor parte

de los ácidos orgánicos son muy poco eficaces como inhibidores del crecimiento microbiano a valores de pH de 5,5-5,8 en los que crecen la totalidad de las bacterias causantes de toxiinfecciones y la mayor parte de las causantes de alteración. Constituyen una excepción los ésteres del ácido parahidroxibenzoico, con un  $pK_a = 8.5$ , que muestran actividad antimicrobiana a valores de pH próximos a la neutralidad, y los ácidos propiónico y sórbico que también poseen cierta actividad a  $pH = 6.0$  ó  $6.5$ .

Por lo general, la utilización de ácidos orgánicos es compatible con la de otros conservadores o sistemas de conservación y de hecho, muchas combinaciones poseen un efecto sinérgico. Por ejemplo, muestran mayor eficacia como inhibidores microbianos a medida que disminuye la temperatura de almacenamiento y mayor eficacia como microbicidas a medida que la temperatura aumenta. Ejemplos de combinaciones sinérgicas son: benzoato con anhídrido sulfuroso, anhídrido carbónico, cloruro de sodio o sacarosa; propionato con anhídrido carbónico; sorbato con sacarosa, cloruro de sodio o con nisina y polifosfato; ácido láctico con ácido acético; propionato con sorbato (contra los estafilococos); y ácido benzoico y bórico contra los *Aspergillus*. Cuando se utilizan tales combinaciones se precisan concentraciones inferiores de cada uno de los componentes para obtener el mismo efecto protector.

### **2.7.1 Ácidos orgánicos en los alimentos**

La eficacia de un ácido orgánico en un alimento se halla afectada de una forma especial por la actividad de agua, el pH, el potencial redox, la disponibilidad de sustrato y el contenido graso. De igual importancia para la selección de un determinado ácido orgánico es la microflora que se pretende inhibir o destruir, y tiene importancia el número de microorganismos, el tipo, la resistencia relativa del microorganismo normalmente presente, así como su habilidad para crecer en las condiciones normales de uso y almacenamiento. Por lo tanto, la elección de un determinado ácido orgánico depende, no sólo de las características inherentes al mismo (por ejemplo, actividad antimicrobiana adecuada, solubilidad, estabilidad y compatibilidad con las propiedades

organolépticas) sino también de las condiciones microambientales y de almacenamiento del alimento.

Posteriormente deben también considerarse en la selección del ácido orgánico los puntos de vista de las autoridades sanitarias. La mayor parte de los países publican los niveles máximos permitidos en los diversos alimentos. Para algunos ácidos orgánicos como el acético, cítrico, y láctico no suelen regularse las concentraciones máximas permitidas. Para que la utilización de un ácido orgánico como conservador sea permitida, es preciso que se demuestre previamente un efecto beneficioso directo o indirecto para el consumidor. Es decir, debe mantener su valor nutritivo, incrementar su suministro, mejorar su conservación doméstica y disminuir sustancialmente su costo o resultar más conveniente para el consumidor.

### **2.7.2 Ácido cítrico y citratos**

El ácido cítrico se presenta en forma natural en las plantas y los animales. El ácido cítrico es común en todas las células y es parte del ciclo del ácido cítrico. El ciclo de Krebs es la última parte de una cadena de reacciones, cuando la glucosa pasa a energía. El método comercial para la producción ácido cítrico es el de la fermentación de un sustrato de hidratos de carbono. El ácido cítrico evita la formación de olor. Se aplica mayoritariamente durante el sacrificio y durante el procesamiento de carne. El ácido cítrico se utiliza para reducir el pH de los alimentos. Cuando se añade a los alimentos, tiene un efecto negativo en el sabor, pero ayuda en la coloración de la carne. El citrato a veces se utiliza como antioxidante para conservar el color de la carne (PURAC<sup>1</sup>, 2000; PURAC<sup>2</sup>, 2000).

### **2.7.3 Ácido acético y acetato**

El acetato es un líquido transparente incoloro y es inestable en forma gaseosa. El ácido acético es uno de los ingredientes antimicrobianos más antiguos utilizado en los alimentos. Es fabricado por la oxidación biológica o por medios sintéticos. El acetato se obtiene por la destilación destructiva de la



madera o del acetileno y agua a través de acetaldehído por oxidación con el aire (PURAC<sup>3</sup>, 1997).

El ácido acético se aplica por su bajo pH, el cual extiende la vida útil del producto y controla el crecimiento microbiano. Además el ácido acético causa hidrólisis parcial de las proteínas, lo que lleva a la producción de productos cárnicos muy específicos. El acetato aumenta la sensibilidad de las bacterias al calor, pero no la de las levaduras o mohos. Esto se debe a su ligero efecto sobre el pH, así que los mohos y levaduras pueden sobrevivir en condiciones de pH relativamente bajo (Lück E, 1997; Smulders F, 1987).

El acetato de sodio se compone de ácido acético y sal sódica. El acetato de sodio es un conservador higroscópico en polvo y es muy soluble en agua. Impide los cambios de color y reduce el valor Aw (Tolboom H., 1997).

El diacetato de sodio es un polvo blanco que consiste en ácido acético y acetato de sodio. Es un polvo, ligeramente higroscópico, sin embargo, libre de material cristalino, con el olor del ácido acético. El diacetato de sodio se utiliza en los alimentos para el control del pH, como saborizante, disminuyendo el valor Aw y como agente antimicrobiano contra mohos y bacterias. La prolongada exposición a un ambiente con baja humedad relativa, provoca que el diacetato de sodio pierda ácido acético y vuelva a acetato de sodio anhidro. Es muy difícil trabajar con el diacetato de sodio debido a su naturaleza higroscópica y sabor intenso. (Wayne State University, 2001; Verdugt, 1997)

#### **2.7.4 Ácido láctico y lactato**

El ácido láctico es un líquido viscoso, incoloro y no volátil. Por lo general, tiene un sabor suave y forma parte del sabor de los productos cárnicos. El ácido láctico se ha utilizado durante siglos para preservar los alimentos. Es natural en los productos fermentados, como yogurt, queso y salchichas. El ácido láctico se utiliza como ingrediente para extender la vida útil, para inhibir microorganismos y para mejorar el sabor y la consistencia (Cubina I., 2001).

El lactato está presente en el tejido muscular animal de forma natural. Después del sacrificio comienza la glicólisis anaerobia, que actúa sobre el glucógeno restante, formando ácido láctico (rigor mortis). La concentración del

ácido láctico en la carne llega a alcanzar niveles superiores al 1%, por lo que puede concluirse que el ácido láctico es un componente natural de diversos productos alimenticios (Cubina I., 2001).

El ácido láctico no puede ser utilizado directamente en su forma ácida en la mayoría de los productos cárnicos. Esto se debe a la disminución de las propiedades del agua ligada, en bajos niveles de pH. Por lo tanto se añaden sales de sodio o de potasio con pH neutro. El lactato de sodio y potasio se fabrica a partir del ácido láctico. El lactato de sodio y potasio se hacen después de la reacción de las materias primas y su purificación (Cubina I., 2001; FOCUS, 2000; PURAC<sup>4</sup>, 2001).

El lactato de sodio es una sal altamente higroscópica con un sabor ligeramente salino. Se utiliza como potenciador del sabor, emulgente, antioxidante, humectante y como conservador. No afecta negativamente el color de la carne. Aplicado en carne fresca, el lactato contribuye a conservar el color rojo del producto cárnico (Houtsma P., 1996; Koos de J.T., 1992;).

El lactato de potasio tiene las mismas propiedades que el lactato de sodio y puede ser utilizado en productos bajos o libres de sodio. En comparación con otras sales de potasio, como cloruro de potasio, el lactato de potasio tiene un sabor más suave. El lactato de potasio evita la formación de productos de oxidación en alimentos refrigerados y congelados, lo que resulta en un mejor sabor, color y olor. Al igual que el lactato de sodio, su función principal en la carne es la conservación (PURAC<sup>6</sup>, 2000; Koos de J.T., 1992;).

Ambos lactatos, sodio y potasio, actúan como bacteriostáticos mediante el incremento de la fase latente (lag) de los microorganismos y agentes patógenos (por ejemplo, patógenos como *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*). El estudio de la acción específica del lactato indica los mecanismos que interfieren con el metabolismo de las bacterias, como la acidificación intercelular, interferir con la transferencia de protones a través de la membrana celular y las reacciones de inhibición. Además de esto, el lactato también reduce la actividad agua. Esta acción antimicrobiana suprime el crecimiento durante largos períodos de tiempo, garantizando una mayor vida útil y el aumento de la seguridad del

producto. Dado que el lactato no mata bacterias, no se puede utilizar para enmascarar malas prácticas de manejo. El nivel de seguridad de los productos cárnicos depende de la carga inicial de bacterias, del saneamiento de la planta, de la manipulación y de la temperatura de almacenamiento (Foodtech asia, 1999; PURAC<sup>7</sup>, 1999; PURAC<sup>8</sup>, 1999).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto de la utilización de cuatro diferentes tratamientos antimicrobianos sobre la vida de anaquel y la calidad sensorial de un producto a base de carne molida de res, así como la eficacia que pueden mostrar para mantener un adecuado control sanitario.

#### **3.2 Objetivos específicos**

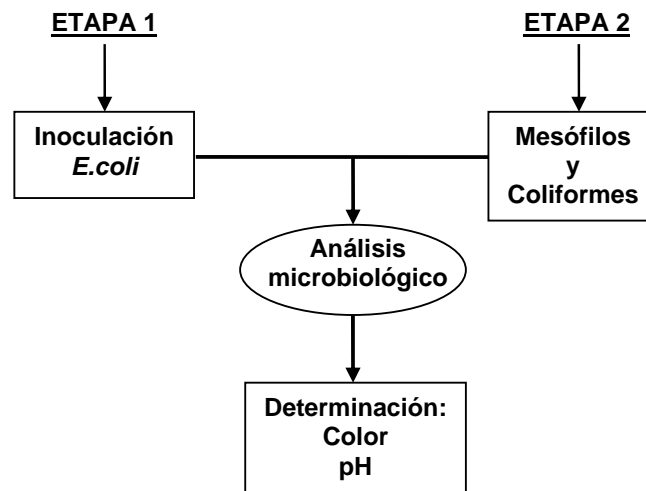
- Desarrollo de un producto cárnico con base en carne molida de res.
- Evaluar los cambios en los productos al utilizar diversos tratamientos de conservación con base en el lactato de sodio, lactato de potasio, acetato-lactato y la combinación de nisina con ácidos orgánicos.
- Evaluar las ventajas y desventajas en la elaboración de productos cárnicos con base en carne molida de res con diversos tratamientos de conservación.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 Estrategia General

Esta investigación se dividió en dos etapas; la primera se concentró en determinar el efecto de cuatro antimicrobianos sobre el crecimiento de *E. coli* en el producto elaborado con carne de res (hamburguesa), así como el efecto sobre los parámetros de color y pH.

La segunda etapa estuvo centrada en la elaboración del producto cárnico de res (hamburguesa), en donde se evaluó el efecto de los cuatro antimicrobianos sobre los microorganismos presentes en la materia prima. La evaluación microbiológica se concentró en la determinación de coliformes totales y mesófilos aerobios. De igual forma se evaluó el color y pH.



### 4.2 Materia Prima

#### 4.2.1 Carne

Para la elaboración del producto cárnico se utilizaron músculos del cuarto delantero de la canal. El músculo se limpió, se eliminó la mayoría del tejido conectivo externo, así como el excedente de grasa para posteriormente cortar la carne en trozos más pequeños y así facilitar su molienda.

Con el músculo ya limpio y en pequeños pedazos, se procedió a molerlo; ya molida la carne se pesó para separarla por grupos y así poder adicionar el producto antimicrobiano correspondiente, finalmente se elaboró el producto cárnico (hamburguesa).

#### **4.2.2 Antimicrobianos**

Los tres productos antimicrobianos empleados en este estudio, que son dependientes del ácido láctico, fueron proporcionados por PURAC MÉXICO, S. DE R. L. DE C. V. Estos productos son:

- PURASAL ® S, es Lactato de sodio al 60%. La presentación de este producto es líquida.
- PURASAL ® HiPure P Plus, es lactato de potasio al 78%. La presentación de este producto es líquida.
- PURASAL Powder XTend, es Acetato-Lactato. Este producto viene en forma sólida (polvo), el cual se debe disolver antes de agregarlo a la carne.

El otro producto antimicrobiano empleado fue INBAC 10-NA, el cual fue proporcionado por Interlimen S.A. de C.V. Este producto es un conservante formulado a base de nisina, ácidos orgánicos (láctico, sórbico y cítrico) y propilparabeno de gran efectividad frente a los microorganismos capaces de alterar los alimentos.

#### **4.3 Desarrollo experimental**

##### **4.3.1 Elaboración de producto cárnico de res**

Para este estudio se elaboró un producto cárnico (hamburguesa), al cual no se le agrego ningún ingrediente extra a excepción de los antimicrobianos. Se hicieron 5 grupos de hamburguesas, cuatro de estos grupos fueron adicionados con el producto antimicrobiano a evaluar y el quinto fue un grupo control (c). El otro producto tiene como base una bacteriocina, la nisina (n). Cada grupo constó de 5 unidades las cuales contenían 6 hamburguesas de 10 gramos cada una.

La administración de los tratamientos antimicrobianos fue del 3% del peso del producto terminado para la combinación de nisina con ácidos orgánicos, el lactato de sodio y lactato de potasio. El acetato-lactato se adicionó al 1% del peso del producto terminado. Al grupo control no se le administró ningún antimicrobiano.

Posteriormente se colocó el producto en bandejas de unicel y se cubrió con película estirable permeable al oxígeno, para así permanecer en refrigeración (4°C) hasta su posterior análisis de la vida de anaquel en un periodo de 10 días. Con las hamburguesas contenidas en cada unidad, se realizaron los análisis de microbiología, color y pH.

La elaboración del producto cárnico se realizó de la misma manera en las dos etapas. También se tomó en cuenta la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-110-SSA1-1994 Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

Según la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-034-SSA1-1993, Bienes y Servicios. Productos de la Carne. Carne Molida y Carne Molida Moldeada. Envasadas. Especificaciones Sanitarias, se entiende por carne molida moldeada envasada, al producto obtenido de la carne fresca de animales de los géneros Bos, Suis, Ovis, Gallus, procedente de rastros que cumplan con lo establecido en el Reglamento, que es cortada y pasada por un molino o picadora, adicionada de otros ingredientes, moldeada, envasada y conservada para su venta al público. Esta misma norma establece que el límite máximo de mesófilos aerobios será de 5 000 000 UFC/g. Pero no dicta ninguna especificación para coliformes.

La Norma Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2002, Productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba, dice que el límite máximo para coliformes fecales (NMP/g), no aplica.

#### **4.3.2 Etapa 1**

En esta etapa al producto de carne molida (hamburguesa) se le inoculó con 30 µL de un cultivo de *E. coli* a una concentración de  $3.6 \times 10^8$  UFC/mL, para poder probar la eficacia de los antimicrobianos. La inoculación de *E. coli* se realizó de manera individual en cada una de las hamburguesas que iban a ser muestreadas durante el estudio. El producto fue analizado durante la vida de anaquel, realizando muestreos durante los días 2, 4, 6 y 8. Para el análisis microbiológico se utilizó como medio selectivo el agar EMB (eosina azul de

metileno) para el correcto crecimiento de *E. coli*. El conteo de las colonias se realizó directamente en la placa.

Durante esta etapa también se analizó el efecto que sobre el color y el pH de esta carne molida inoculada tuvieron los tratamientos antimicrobianos y los días de almacenamiento.

Previo a la inoculación de *E. coli*, el microorganismo se cultivo para su readaptación, en caldo soya tripticaseina, ya que esta cepa venia de un estado de ultracongelación.

#### **4.3.3 Etapa 2**

En esta etapa se evaluó la eficacia que pudieran conferir los productos antimicrobianos a las muestras cárnicas del producto, para lo cual, se determinó la presencia de coliformes totales y mesófilos aerobios contenidos en la materia prima a lo largo de tiempo. El producto fue analizado durante la vida de anaquel, realizando muestreos durante los días 2, 4, 6, 8 y 10.

La evaluación de mesófilos aerobios se basó en la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-092-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA.

La evaluación de coliformes totales se basó en la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-113-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE MICROORGANISMOS COLIFORMES TOTALES EN PLACA.

Durante esta etapa también se analizó el efecto que sobre el color y el pH de esta carne molida sin inocular tuvieron los tratamientos antimicrobianos y los días de almacenamiento.

#### **4.3.4 Determinación de color**

Se empleó un colorímetro Hunter Lab modelo 11491, *Color Flex* (Reston, Virginia) por el método de Little (1975). El software utilizado fue la versión 3.73, incluido en el equipo. Para su calibración se empleó una cerámica blanca y una negra, con un estandar de iluminación D65/10°. Se obtuvieron los valores de CIE  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ . Las muestras se analizaron por triplicado rotando el portamuestras 90° en cada lectura.



#### **4.3.5 Determinación de pH**

Para este análisis se utilizaron 10 g de muestra de carne, a estos se les añadió 90 mL de agua destilada. Posteriormente se homogenizó y la mezcla de carne obtenida se filtró, para eliminar el tejido conectivo y finalmente se midió el pH del filtrado en un potenciómetro Beckman (Palo Alto California, E.U.), modelo pH 50. El equipo se calibró con las soluciones buffer de referencia marca Hycel, con pH  $7.00 \pm 0.01$  a  $25^{\circ}\text{C}$  (solución de fosfatos de sodio y potasio) y con pH  $4.00 \pm 0.01$  a  $25^{\circ}\text{C}$  (solución de ftalato de ácido de potasio). El análisis se realizó de la misma manera en las dos etapas.

#### **4.3.6 Análisis microbiológico**

La evaluación microbiológica de este estudio se realizó de acuerdo a lo señalado en la NOM-092-SSA1-1994, para mesófilos aerobios y la NOM-113-SSA1-1994, para la evaluación de coliformes totales y *E. coli*.

#### **4.3.7 Análisis sensorial**

El producto cárnico elaborado, con su respectivo antimicrobiano, fue sometido a estudio de sus propiedades de sabor, textura y aspecto general. Para esto se utilizó una prueba sensorial con cincuenta panelistas no entrenados (consumidores de diversas escalas sociales, culturales y hábitos alimenticios). El panel de evaluación estuvo compuesto por 30 hombres y 20 mujeres, con un rango de edad de los 17 a los 40 años. Esta prueba sensorial se basó en la utilización de la escala hedónica estructurada, en la cual 1 significa disgusta extremadamente y 7 gusta extremadamente. Con esta escala, el panelista respondió y eligió el producto basándose en los atributos sensoriales que le ofrecen los diferentes productos de acuerdo a su nivel de agrado (Meilgaard, M. y col., 1991). El producto cárnico fue proporcionado a los panelistas aleatoriamente codificado, de acuerdo a la TABLA H de números aleatorios. Las muestras se presentaron a los jueces ya listas para ser probadas, en una charola junto con una galleta sin sal y un vaso de agua para enjuagarse la boca. Al producto cárnico (hamburguesas), no se le adicionó ningún ingrediente extra, a excepción de los antimicrobianos.

#### **4.4 Análisis estadístico**

Para el análisis de los datos se empleó el programa estadístico SAS, haciendo uso del modelo GLM (General Lineal Model) con la finalidad de hacer un análisis de varianza entre los diferentes tratamientos aplicados. Las variables de clase (efectos principales) fueron tratamientos antimicrobianos y días de almacenamiento. El modelo utilizado fue el siguiente:  $Y = a + b (\text{trt}) + c (\text{dias}) + d (\text{trt} * \text{dias}) + \text{error}$ . Cuando la interacción fue positiva se graficaron los resultados y se mostraron en forma de cuadro los efectos principales. En el caso de interacciones negativas se presentan exclusivamente en forma de cuadro los efectos principales.

Para el análisis de los datos obtenidos de la evaluación sensorial se utilizó el modelo Kruskal-Wallis Test, del programa estadístico SAS.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Etapa 1

En esta etapa se presentan los resultados obtenidos sobre la supervivencia del *E. coli*, el color y pH de carne molida inoculada después de haberse tratado con los diferentes antimicrobianos.

La Figura 1 muestra el efecto de la interacción del tratamiento antimicrobiano y días en almacenamiento sobre las UFC de muestras de carne molida inoculadas con *E. coli*. Se observa el óptimo control microbiano que ejerció el tratamiento de la combinación de nisina con ácidos orgánicos, pues a lo largo del periodo de almacenamiento que constó de 10 días, mantuvo niveles de crecimiento bacteriano por debajo de las 200 UFC. Sin embargo, no ocurrió lo mismo con los tratamientos de lactato de sodio y potasio (Ina y lk), ya que desde el cuarto día de almacenamiento las muestras presentaron un elevado crecimiento microbiano entre las 800 y 1000 UFC. Por otra parte, el tratamiento con acetato-lactato logro un buen nivel de inhibición del crecimiento bacteriano hasta el día cuatro, después de éste el resultado no fue tan efectivo y se elevó drásticamente el conteo de UFC. Como era de esperarse, el tratamiento control tuvo valores incontables al momento de hacer el conteo microbiológico a partir del día 2 del estudio.

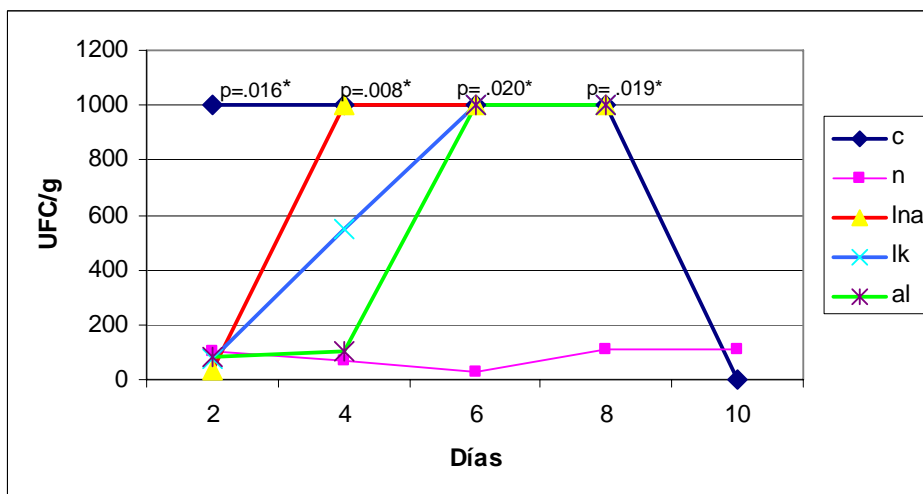


FIGURA 1. Efecto de la interacción del tratamiento antimicrobiano y días en almacenamiento sobre las **UFC** de muestras de carne molida inoculadas con *E. coli*.

c: control, n: nisina; Ina: lactato de sodio; lk: lactato de potasio; al: acetato-lactato.

Día 2, nisina vs control (P=0.0167); Día 4, nisina vs Ina (P=0.0078); Día 6, nisina vs al (P=0.0203); Día 8, nisina vs al (P=0.0193)

Las Figuras 2 y 3, respectivamente, muestran el efecto de los tratamientos antimicrobianos sobre las características de color (L y a) de las muestras de carne molida, inoculadas con *E. coli*. Como se puede observar el tratamiento con la combinación de nisina y ácidos orgánicos provoca que las muestras de carne obtengan la mayor luminosidad (L=37.6) al mantener un valor constante entre 37 y 39 a lo largo de los 10 días de almacenamiento. De igual forma el color rojo en las muestras tratadas con la combinación de nisina y ácidos orgánicos, presenta valores elevados (a=9.6) en comparación con los otros tratamientos, observamos que existe una disminución constante en el parámetro conforme pasaron los días de almacenamiento, sin embargo, esta no fue muy drástica, lo que significa que la carne presenta características de mayor frescura que las demás, sin perder la luminosidad ni el color rojo en el transcurso del tiempo. Por otra parte, el tratamiento control indica que al no emplearse algún antimicrobiano la carne pierde mucha luminosidad, esto lo podemos observar a partir del día 4 de almacenamiento, en el cual se presentó una disminución en el valor de "L" de 36 a 31 para el día 6 de la investigación; en el caso del parámetro "a" se presentó una disminución en los valores conforme pasaron los 10 días de almacenamiento, sin embargo, es importante mencionar que los tratamientos antimicrobianos a excepción de la combinación de nisina y ácidos orgánicos, no pudieron hacer retener el color rojo de la carne, por lo que su deterioro es significativo.

Como era de esperar todos los parámetros de color estudiados fueron deteriorándose conforme pasaban los días de almacenamiento. La carne ofrece la menor luminosidad y el nivel más bajo de color rojo al día décimo del estudio, comparado con cualquier otro día de almacenamiento, en todos los tratamientos empleados. De igual forma se puede observar una tendencia a la disminución del parámetro "L" de color, en todos los tratamientos empleados, posterior al sexto día de almacenamiento a excepción de las muestras tratadas con la combinación de nisina y ácidos orgánicos, en las cuales existió un aumento en el valor. Cabe destacar que el grupo control presenta una disminución en los valores de L y a desde el segundo día de almacenamiento.

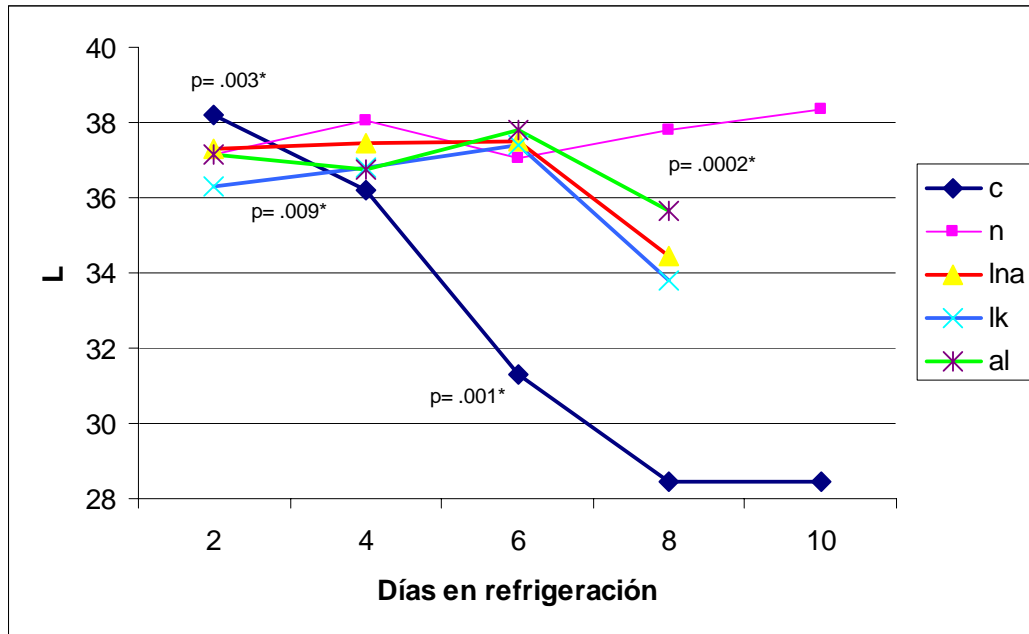


FIGURA 2. Efecto de la interacción de tratamiento antimicrobiano y días en almacenamiento sobre la luminosidad (L) de color de muestras de carne molida inoculadas con *E. coli*. c: control, n: nisina; lna: lactato de sodio; lk: lactato de potasio; al: acetato-lactato. Día 2, nisina vs control (P=0.0038); Día 4, nisina vs control (P=0.0095); Día 6, nisina vs control (P=0.0011); Día 8, nisina vs al (P=0.0002).

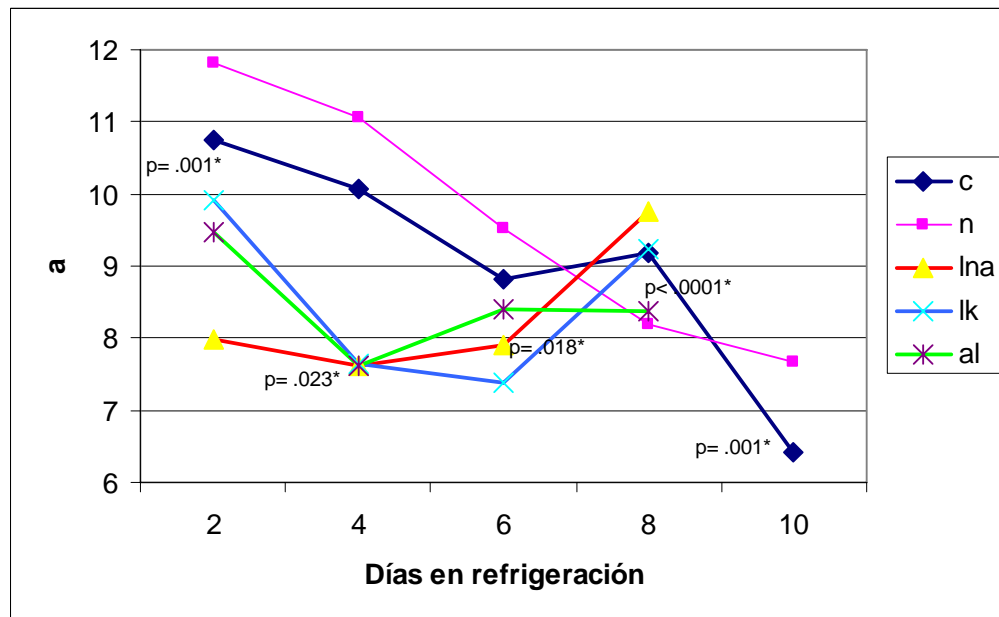


FIGURA 3. Efecto de la interacción de tratamiento antimicrobiano y días en almacenamiento sobre el color rojo (a) de muestras de carne molida inoculadas con *E. coli*. c: control, n: nisina; lna: lactato de sodio; lk: lactato de potasio; al: acetato-lactato. Día 2, nisina vs lk (P=0.0014); Día 4, nisina vs lk (P=0.0237); Día 6, nisina vs lna (P=0.0182); Día 8, nisina vs al (P<0.0001); Día 10, nisina vs el control (P=0.0011).

La Figura 4 señala el efecto de los antimicrobianos sobre el pH de la carne molida. Se observa que el tratamiento control tiene un incremento en el pH, el cual inició con un valor de 5.7 en el día 2 y al finalizar el estudio (día 10) presentó un valor de 8.2, esto ocurre como consecuencia del crecimiento de los microorganismos tanto inoculados como los que pudo haber adquirido la carne al momento de la molienda. También se observa, que el tratamiento con la combinación de nisina y ácidos orgánicos es el más eficaz en mantener un pH apropiado para el control microbiológico, pues logra colocarlo en valores por debajo de 5.5 durante los 10 días de almacenamiento. No así los demás tratamientos, que presentan un comportamiento muy similar entre ellos pero diferente al de la combinación de nisina y ácidos orgánicos. En estos casos a excepción de la combinación de nisina y ácidos orgánicos, desde el primer muestreo (día 2), el pH presentó valores más elevados y conforme pasaron los días de almacenamiento estos fueron aumentando de forma considerable.

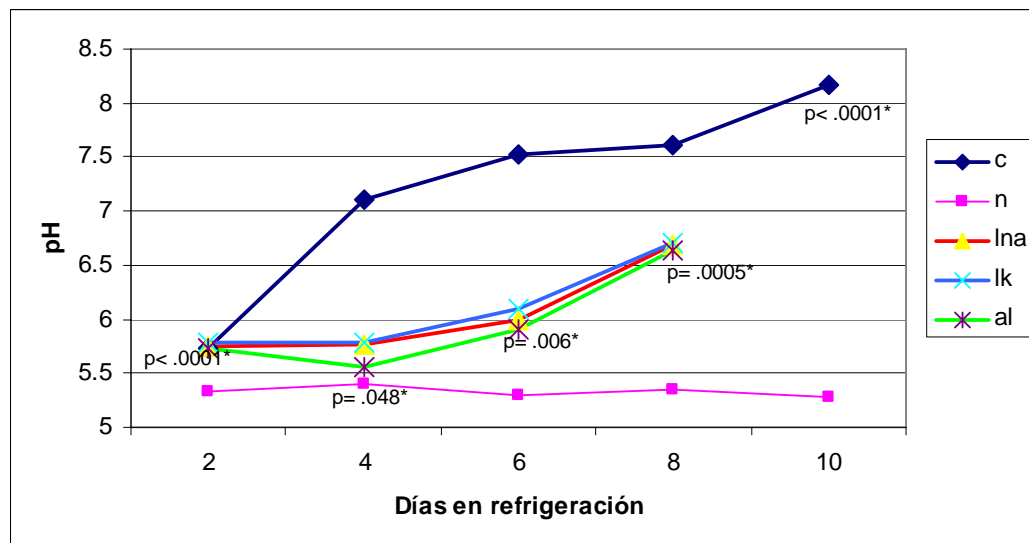


FIGURA 4. Efecto de la interacción de tratamiento antimicrobiano y días en almacenamiento sobre la característica de **pH** de muestras de carne molida inoculadas con *E. coli*. c: control, n: nisina; Ina: lactato de sodio; Ik: lactato de potasio; al: acetato-lactato. Día 2, nisina vs Ik (P=0.0001); Día 4, nisina vs al (P=0.0482); Día 6, nisina vs al (P=0.0067); Día 8, nisina y al (P=0.0005); Día 10, nisina vs el control (P<0.0001).

## 5.2 Etapa 2

En esta etapa se presentarán los resultados obtenidos de la evaluación por día, hecha a los antimicrobianos adicionados al producto cárnico, y el efecto causado en los microorganismos (mesófilos y coliformes) presentes en la carne utilizada para la elaboración de las hamburguesas. También se presenta el efecto causado sobre el color y pH de la carne a lo largo del tiempo.

El Cuadro 3 nos muestra el efecto de los tratamientos antimicrobianos sobre el conteo de mesófilos y coliformes de hamburguesas refrigeradas. Como se puede observar las muestras de carne tratadas con la combinación de nisina y ácidos orgánicos obtuvieron el mayor grado de protección en contra del crecimiento bacteriano, tanto en el grupo de los mesófilos como en el de los coliformes. Se observó que el mayor nivel de protección conferido por el tratamiento con nisina, se presentó en los coliformes, ya que presentó un bajo nivel de UFC/g (71.96) en comparación con los otros tratamientos. En el caso de los mesófilos, la combinación de nisina y ácidos orgánicos también actuó como se esperaba, al no permitir el crecimiento microbiano por encima de las 117 UFC/g, lo que ninguno de los demás tratamientos logró realizar. En lo que respecta al grupo control, podemos observar que en este se presentó el nivel más elevado de UFC/g en ambas mediciones ( $P < 0.05$ ); los valores están muy por encima de los obtenidos en los otros grupos y principalmente de los tratados con la combinación de nisina y ácidos orgánicos. Cabe mencionar que el tratamiento antimicrobiano menos efectivo en lo respecta al crecimiento de mesófilos y coliformes fue el acetato lactato, siendo este grupo estadísticamente igual al grupo control. Es importante mencionar que los tratamientos con LNa y LK son estadísticamente iguales ( $P < 0.05$ ) en ambos conteos.

Cuadro 3. Efecto de los tratamientos antimicrobianos sobre el conteo de mesófilos y coliformes de hamburguesas refrigeradas.

TRT	MESOFILOS	E.E.	COLIFORMES	E.E.
C	620.88 <sup>a</sup>	56.03	508.02 <sup>a</sup>	54.77
N	117.08 <sup>b, d</sup>	56.03	71.96 <sup>b</sup>	54.77
LNa	252.46 <sup>c, d</sup>	56.03	250.80 <sup>c, e</sup>	54.77
LK	325.12 <sup>c, e</sup>	56.03	299.84 <sup>d, e</sup>	54.77
AL	479.98 <sup>a, e</sup>	56.03	424.46 <sup>a, d</sup>	54.77

a, b, c, d, e Literales diferentes dentro de la misma columna indica medias diferentes significativamente ( $P < 0.05$ ).

C: control; N: nisina; LNa: lactato de sodio; LK: lactato de potasio; AL: acetato-lactato. E.E.: Error Estándar. TRT: tratamiento

En el Cuadro 4 se presenta el efecto de los días de almacenamiento sobre el conteo de mesófilos y coliformes de hamburguesas tratadas con diferentes antimicrobianos. Con este cuadro podemos observar como el crecimiento bacteriano, aunque logra ser controlado por el tratamiento con la combinación de nisina y ácidos orgánicos, siempre se mantiene en un aumento constante de la población bacteriana. Aunque podemos ver, y las literales nos lo indican de mejor forma, como durante los primeros 6 días de almacenamiento el crecimiento de los mesófilos, se comportó de una manera uniforme. Después de lo cual su crecimiento fue más rápido, pues al octavo día prácticamente ya había duplicado su número; y al décimo día ya lo había triplicado. Algo similar pasó en el caso de los coliformes, en los cuales su crecimiento se mantuvo mas o menos estable hasta el octavo día de almacenamiento, pues no hubo diferencia significativa en sus medias ( $p < 0.05$ ). Para el día diez, su número prácticamente era del doble. Esto nos muestra el efecto favorable que tuvo el haber adicionado a la carne los productos antimicrobianos, pues el retraso en su crecimiento fue evidente.



Cuadro 4. Efecto de los días de almacenamiento sobre el conteo de mesófilos y coliformes de hamburguesas tratadas con diferentes antimicrobianos.

DIA	MESOFILOS	E.E.	COLIFORMES	E.E.
2	209.03 <sup>a</sup>	51.15	191.56 <sup>a</sup>	50
4	263.18 <sup>a</sup>	51.15	184.63 <sup>a</sup>	50
6	262.86 <sup>a</sup>	51.15	216.01 <sup>a</sup>	50
8	410.81 <sup>b</sup>	51.15	309.53 <sup>a</sup>	50
10	613.46 <sup>c</sup>	51.15	601.01 <sup>b</sup>	50

<sup>a, b, c</sup> Literales diferentes dentro de la misma columna indica medias diferentes significativamente ( $P < 0.05$ ). E.E.: Error Estándar.

Las Figuras 5 y 6, respectivamente, muestran el efecto de la interacción del tratamiento antimicrobiano y los días en almacenamiento sobre los parámetros L y a de color de muestras de carne molida. El tratamiento con acetato-lactato presentó los mejores resultados, podemos observar que desde el inicio del estudio (día 2) presenta valores muy elevados ( $L=41.5$ ) con respecto a la luminosidad y estos valores fueron incrementando conforme pasaron los días de almacenamiento hasta llegar al décimo día de la evaluación ( $L=43$ ), de igual manera en lo que respecta al color rojo (a), el grupo tratado con acetato-lactato presentó al paso de los 10 días de almacenamiento un valor muy por encima de los otros tratamientos; todo esto nos provoca que las muestras obtengan la mayor luminosidad y el color más rojo, lo que significa que la carne aparecería con características de mayor frescura que las demás, sin perder la luminosidad ni el color rojo. El tratamiento control nos indica como sin el uso de antimicrobianos la carne pierde mucha luminosidad conforme pasa el tiempo de almacenamiento, esto ocurrió sobre todo después del sexto día de almacenamiento, donde se puede observar una disminución muy marcada en el valor "L". Todos los tratamientos se mantuvieron con una luminosidad estable (en su respectivo rango de actuación) hasta el cuarto día, después del cual tuvieron un ligero repunte en el día seis, para después ir ofreciendo menor luminosidad con el paso del tiempo con excepción del acetato-lactato.

La carne ofrece el nivel más bajo de color rojo (Figura 6) al día décimo comparado con cualquier otro día de almacenamiento. Se puede observar una tendencia a la disminución de los valores de color conforme pasan los días. Sin embargo, los tratamientos antimicrobianos a excepción del acetato-lactato, no pudieron hacer retener el color rojo de la carne, por lo que su deterioro es significativo ( $P < 0.05$ ).

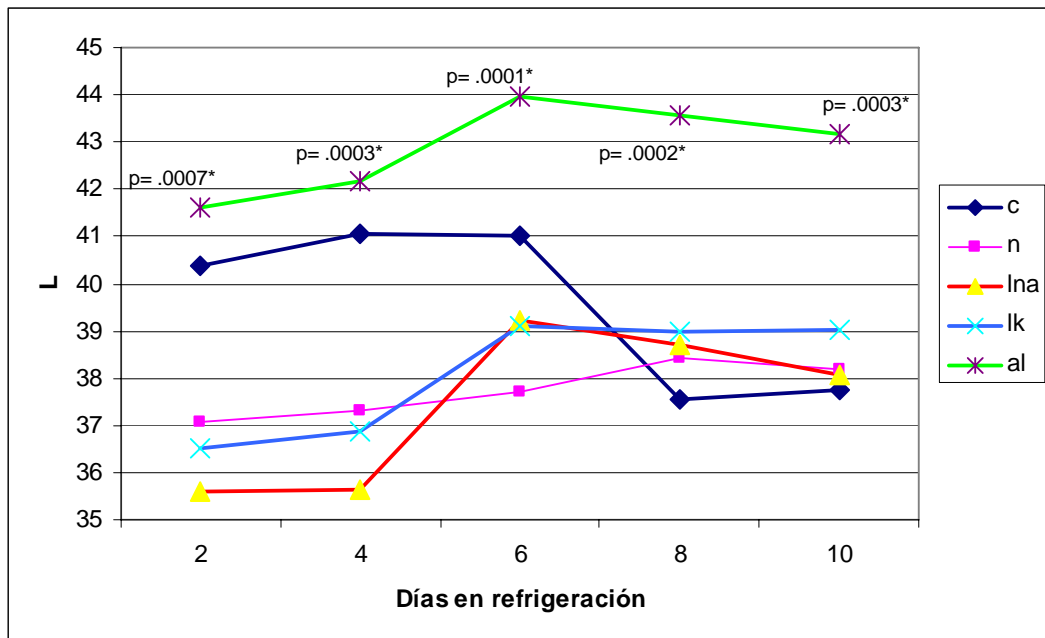


FIGURA 5. Efecto de la interacción del tratamiento antimicrobiano y días en almacenamiento sobre el parámetro L de color de muestras de carne molida. c: control; n: nisina; Ina: lactato de sodio; lk: lactato de potasio; al: acetato-lactato. Día 2, nisina vs al ( $P=0.0007$ ); Día 4, nisina vs al ( $P=0.0003$ ); Día 6, nisina vs al ( $P=0.0001$ ); Día 8, nisina vs al ( $P=0.0002$ ); Día 10, nisina vs al ( $P=0.0003$ ).

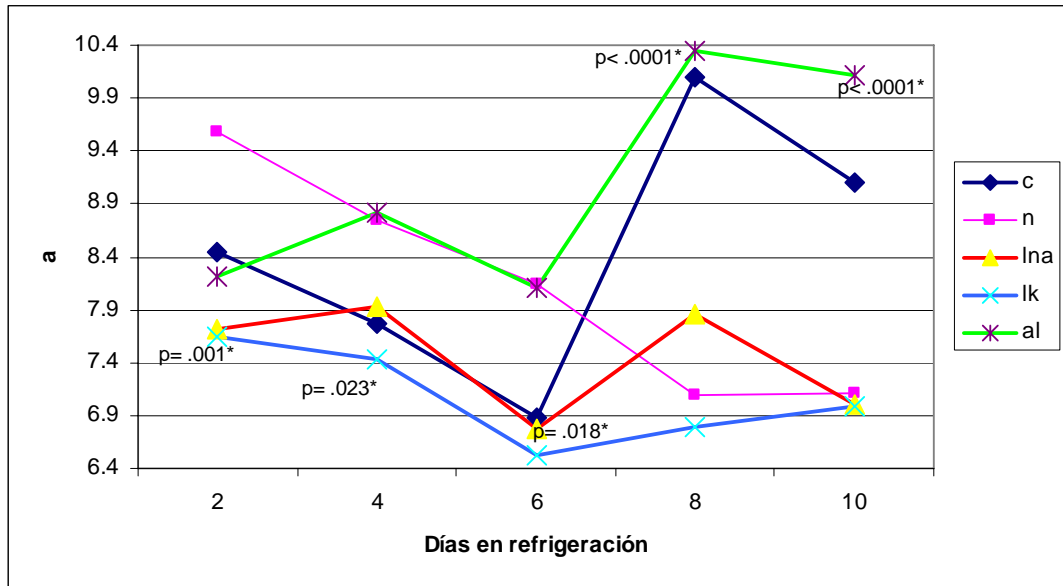


FIGURA 6. Efecto de la interacción del tratamiento antimicrobiano y días en almacenamiento sobre el parámetro **a** de color de muestras de carne molida. c: control, n: nisina; lna: lactato de sodio; lk: lactato de potasio; al: acetato-lactato. Día 2, nisina vs lk (P=0.0014); Día 4, nisina vs lk (P=0.0237); Día 6, nisina vs lna (P=0.0182); Día 8, nisina vs al (P<0.0001); Día 8, nisina vs al (P<0.0001).

La Figura 7 señala claramente el efecto de los antimicrobianos sobre el control del pH de la carne molida. Se puede observar, que el tratamiento con la combinación de nisina y ácidos orgánicos es el más eficaz en mantener un pH apropiado para el control microbiológico, pues logra colocarlo en valores por debajo de 5.5 durante los 10 días de almacenamiento del producto. Los tratamientos con lactato de sodio, acetato-lactato y lactato de sodio, presentaron un comportamiento muy similar en el transcurso de la investigación; es decir, durante los días 4 y 6 presentaron una estabilización en sus valores entre 5.6 a 5.8, y al día 8 estos valores disminuyeron hasta alcanzar un pH de 5.3 en los 3 tratamientos. De igual forma se observa como el tratamiento control presenta un pH elevado al cabo del día 10 del estudio, como consecuencia del crecimiento de los microorganismos, existiendo un incremento muy marcado después del sexto día.

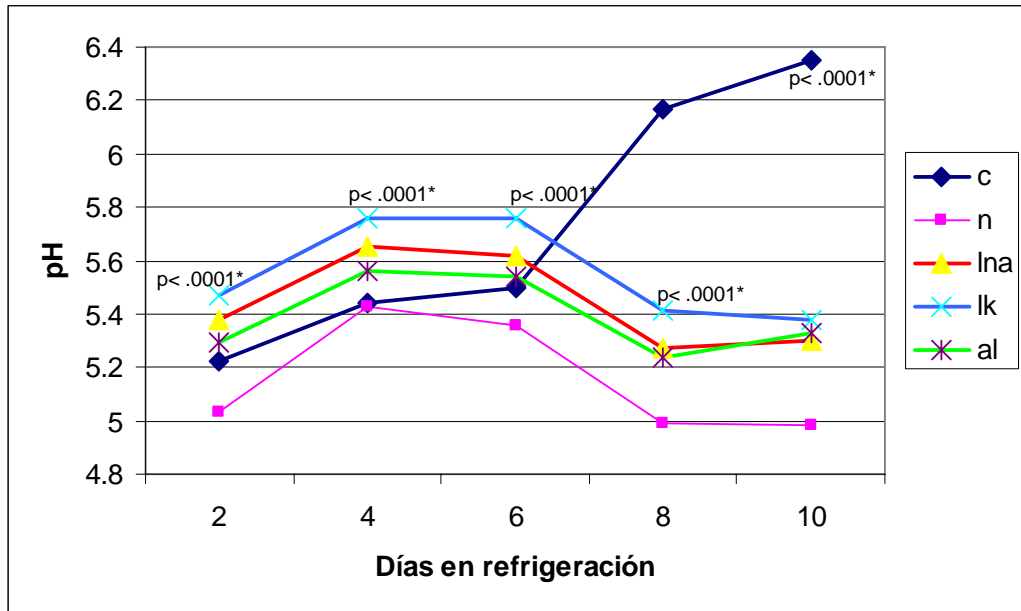


FIGURA 7. Efecto de la interacción de tratamiento antimicrobiano y días en almacenamiento sobre la característica de **pH** de muestras de carne molida.

c: control, n: nisina; Ina: lactato de sodio; lk: lactato de potasio; al: acetato-lactato.

Día 2, nisina vs lk ( $P < 0.0001$ ); Día 4, nisina vs lk ( $P < 0.0001$ ); Día 6, nisina vs lk ( $P < 0.0001$ ); Día 8, nisina vs lk ( $P < 0.0001$ ); Día 10, nisina vs control ( $P < 0.0001$ ).

### 5.3 Análisis sensorial

En esta etapa se presentan los resultados obtenidos de la evaluación sensorial hecha al producto cárnico (hamburguesas) adicionado con los tratamientos antimicrobianos y el efecto causado sobre el sabor, la textura y el aspecto general.

El Cuadro 5 nos muestra el efecto que tuvieron los tratamientos antimicrobianos sobre el sabor, la textura y el aspecto general de las hamburguesas. En cuanto al sabor podemos observar que el tratamiento antimicrobiano con menor nivel de aceptación por parte de los panelistas fue el que contenía la combinación de nisina y ácidos orgánicos en su formulación, así como también podemos ver que fue el único tratamiento diferente estadísticamente ( $P < 0.05$ ) en comparación con los demás. De manera contrastante podemos ver que el tratamiento con el mayor nivel de aceptación por el panel fue el que no contenía ningún antimicrobiano (control) para su elaboración. Los otros tratamientos se comportaron de manera similar, siendo

iguales estadísticamente. En el caso de la textura, el tratamiento que tuvo el menor valor fue la hamburguesa que contenía lactato de sodio (LNa). Nuevamente se encontró al tratamiento control como el más aceptado en lo que respecta a este parámetro, en comparación con las hamburguesas que contenían algún antimicrobiano. Como bien lo muestra el cuadro, estadísticamente se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos control, en la combinación de nisina con ácidos orgánicos y el lactato de sodio. En lo referente al aspecto general de las hamburguesas, el tratamiento antimicrobiano con menor nivel de aceptación por parte del grupo de panelistas fue el que contenía nisina entre sus ingredientes, así como también podemos ver que fue el único tratamiento que presentó diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en comparación con los demás. De nuevo podemos ver que el tratamiento mejor posicionado fue el que carecía de antimicrobiano en su elaboración. Los otros tratamientos se comportaron de manera similar ya que fueron iguales estadísticamente.

Cuadro 5 Efecto de los tratamientos antimicrobianos sobre el sabor, la textura y el aspecto general de las hamburguesas.

TRATAMIENTO	SABOR	TEXTURA	ASPECTO GENERAL	E.E.
Control	5.10 <sup>a</sup>	5.04 <sup>a</sup>	5.04 <sup>a</sup>	0.17
Nisina	4.28 <sup>b</sup>	4.56 <sup>b,c</sup>	4.20 <sup>b</sup>	0.17
Lactato de sodio	5.08 <sup>a</sup>	4.44 <sup>b,c</sup>	4.90 <sup>a</sup>	0.17
Lactato de potasio	5.00 <sup>a</sup>	4.66 <sup>a,c</sup>	4.92 <sup>a</sup>	0.17
Acetato-Lactato	4.90 <sup>a</sup>	4.66 <sup>a,c</sup>	4.92 <sup>a</sup>	0.17

<sup>a, b, c</sup> Literales diferentes dentro de la misma columna indica medias diferentes significativamente ( $P < 0.05$ ). E.E.: Error Estándar.

## 6. DISCUSIÓN

La carne es una rica matriz nutritiva que provee un excelente ambiente para la proliferación de microorganismos deteriorantes y patógenos, por lo que para su conservación se requieren técnicas adecuadas para mantener su seguridad y calidad. La seguridad alimentaria es la mayor prioridad para las autoridades sanitarias que controlan la industria de los alimentos. Para los consumidores, la inocuidad es también el principal requisito, por lo que el objetivo de esta seguridad y el análisis de los puntos críticos de control se han extendido en su implementación alrededor del mundo. No obstante, la prevalencia de patógenos en los alimentos y el reporte de número de casos y brotes continúan altos, afectando la vida, negocios, y economía mundial (Aymerich, 2008).

El consumidor demanda productos cárnicos de alta calidad, convenientes, innovadores, seguros, de sabores naturales y una mayor vida de anaquel. Así como con menos sal y con una menor cantidad de productos químicos como conservadores. Para cumplir todas estas demandas sin comprometer la seguridad, la producción y manufactura de productos cárnicos, se está en una etapa de innovación en la cual se estimula una mayor investigación y desarrollo de productos e implementación de tecnologías alternativas (Aymerich, 2008).

Minimizar la contaminación del producto y retrasar o inhibir el crecimiento de microorganismos deteriorantes o patógenos, es la clave para mejorar la frescura y la vida de anaquel, aumentando la seguridad del consumidor (Sallam & Samejima, 2004).

Nuestros resultados mostraron que en la primera etapa se encontró un efecto de la interacción del tratamiento antimicrobiano y los días en almacenamiento sobre las UFC/g de muestras de carne molida inoculadas con *E. coli*. Se observó que el óptimo control microbiano se obtuvo con el tratamiento con la combinación de nisina y ácidos orgánicos.

Aunque algunas bacteriocinas han sido probadas en alimentos, la nisina es la única que se vende comercialmente como un aditivo. Tiene una amplia historia de uso seguro y se ha documentado su efectividad en contra de

agentes patógenos gram positivos y microorganismos deteriorantes (Aymerich, 2008).

En carne fresca, ha sido estudiada la aplicación de nisina en canales rociadas para sanitizar su superficie (Cutter & Siragusa, 1994) y para descontaminar carne de puerco artificialmente contaminada (Murray & Richard, 1997), combinada con el 2% de lactato de sodio para el control de *S. aureus* y *Salmonella* en salchichas de cerdo (Scannell et al., 1997) y combinada con 2% de cloruro de sodio como agente antilisteria en carne molida (Pawar et al., 2000).

Actualmente la nisina es la única bacteriocina disponible comercialmente y aceptada como un aditivo en alimentos (E234) (European Parliament & of the Council, 1995), sin embargo su uso en productos cárnicos no está regulado (Aymerich, 2008).

La inclusión de aditivos es una estrategia empleada para minimizar y controlar los cambios en las carnes frescas. Las sales del ácido láctico, de sodio o de potasio, han demostrado que demoran el crecimiento de microorganismos deteriorantes de la carne (Brewer et al., 1995; Shelef, 1994). Estas sales también se han utilizado como potencializadores del sabor (Duxbury, 1990; USDA, 1993). En el estudio realizado por Solomakos, 2008, con carne molida de res, almacenada en refrigeración y a la cual se le adicionó nisina para poder observar su efecto antimicrobiano en contra de *E. coli* O157:H7, se describe que la adición de nisina no mostró efecto alguno en contra de dicha bacteria, sin embargo en el presente estudio al evaluar la combinación de nisina con ácidos orgánicos, se puede observar que el efecto en contra de *E. coli* O157:H7 es positivo, es decir, ejerce un óptimo control microbiano.

Los tratamientos de lactato de sodio y potasio (I<sub>na</sub> y I<sub>k</sub>) y el acetato-lactato empleados en este estudio pudieron controlar las UFC/g de *E. coli* hasta el cuarto día de almacenamiento. El ácido láctico y sus sales han sido ampliamente utilizados en la industria cárnica para aumentar el sabor, y extender la vida de anaquel del producto. Se ha reportado actividad antimicrobiana en contra de *Cl. botulinum*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*,

*Salmonella* y *E. coli* 0157:H7 (Aymerich et al., 2005; Glass et al., 2002; Porto et al., 2002; Shelef & Potluri, 1995).

Las hamburguesas tratadas con la combinación de nisina y ácidos orgánicos obtuvieron una mayor protección en contra del crecimiento bacteriano, comparadas con los demás tratamientos. Esto ocurrió tanto en el grupo de los mesófilos como en el de los coliformes. De los otros tratamientos antimicrobianos, el que menor efecto tuvo en cuanto al crecimiento de mesófilos y coliformes fue el acetato lactato, ya que este grupo fue estadísticamente igual al grupo control.

Aunque se aplicaron los tratamientos, durante los primeros 6 días de almacenamiento a los mesófilos, el crecimiento de estos aumentó de una manera uniforme. Después de lo cual su crecimiento fue más rápido, pues al octavo día prácticamente ya habían duplicado su número; y al décimo día ya lo había triplicado. De manera similar ocurrió en el caso de los coliformes, en los cuales su crecimiento se mantuvo mas o menos estable hasta el octavo día de almacenamiento, pues no hubo diferencia significativa en sus medias ( $p < 0.05$ ). Para el décimo día de almacenamiento, su número prácticamente era del doble que el grupo control. Con esto podemos observar el efecto favorable que tuvo el haber adicionado a la carne los productos antimicrobianos, pues el retraso en el crecimiento de los microorganismos fue evidente. Se ha visto que el grado de inhibición de mesófilos, psicrotrofos y *L. monocytogenes*, aumenta conforme se incrementa la concentración de nisina y se disminuye la temperatura de almacenamiento (Pawar et al., 2000). El estudio realizado por Tan (2002), con carne fresca de cerdo, almacenada a 2°C por 15 días, previamente tratada con lactato de sodio o potasio (2%), demostró que los lactatos podían mantener la estabilidad microbiana de la carne.

Otro estudio con carne de cerdo, realizado por Jensen 2003, nos muestra que después de 96 horas de almacenamiento, la carne que fue tratada con lactatos tuvo un menor conteo de aerobios en placa que el control e incluso fue menor a otras muestras tratadas con otros antimicrobianos. En el estudio realizado por Drosinos (2006), en el cual se utilizó lactato de sodio como antimicrobiano, se observó que este producto logró extender de manera



efectiva la vida de anaquel de las muestras diez días más. En general, varias sales del ácido láctico, acético u otros ácidos orgánicos, han demostrado actividad antibacteriana en medios bacteriológicos o productos alimenticios bajo condiciones de laboratorio (Bedie et al., 2001; Mbandi & Shelef, 2001; Samelis et al. 2002; Seman, 2002). En el estudio realizado por Seyfert 2007, se mostró la eficacia de los lactatos para retrasar el crecimiento de los microorganismos. Los lactatos tradicionalmente han sido utilizados para mejorar la calidad de los productos cárnicos curados o cocidos, sin embargo, existen pocos reportes de su uso en carne cruda (Jensen et al., 2003; Sallam & Samejima, 2004).

El efecto de la combinación de nisina y ácidos orgánicos sobre las características de color (valores L y a) de las muestras de carne molida, inoculadas con *E. coli*. provoca que las muestras de carne obtengan la mayor luminosidad y color rojo a lo largo de los 10 días de almacenamiento. Los tratamientos antimicrobianos, a excepción del que contenía la combinación de nisina y ácidos orgánicos, no pudieron hacer retener el color rojo de la carne, por lo que su deterioro es significativo. En la segunda etapa del estudio el tratamiento con mejores resultados, respecto a la luminosidad y al color rojo fue el de acetato-lactato. Estos valores fueron incrementando conforme pasaron los días de almacenamiento hasta llegar al décimo día de la evaluación. Sin el uso de antimicrobianos la carne pierde mucha luminosidad conforme pasa el tiempo de almacenamiento, como bien nos indica el tratamiento control. Esto ocurrió después del sexto día de almacenamiento, donde se puede observar una disminución muy marcada en la luminosidad (valor L). Los demás tratamientos se mantuvieron con una luminosidad estable (en su respectivo rango de actuación) hasta el día cuatro de almacenamiento, después del cual tuvieron un ligero repunte al sexto día, para después ir brindando una menor luminosidad con el paso del tiempo con excepción del acetato-lactato. En estudios recientes se ha sugerido que el lactato de potasio puede ser de gran beneficio en la carne inyectada, tanto para el color, como para la estabilidad de este (Lawrence et al., 2004; Mancini et al., 2005). Con respecto a los efectos sobre el color, Brewer (1995), informó de una disminución en el color rojo de la

carne (valor  $a^*$ ), conforme se iba aumentando el lactato de sodio en carne de cerdo. En el estudio realizado por Tan (2002), se pudo demostrar que el color rojo de la carne (valor  $a^*$ ), mejoró inmediatamente después de la adición de lactatos (sodio o potasio). Sin embargo, todos los tratamientos, incluido el control, mostraron una disminución en el color después del cuarto día de almacenamiento en refrigeración. En el estudio de Jensen 2003, con carne de cerdo tratada con lactatos, se observó que la carne mantuvo altos valores en cuanto al color rojo. Aunque tuvo una pequeña decoloración visual después de 96 horas. Knock (2006), realizó un estudio para medir la estabilidad del color en carne de res adicionando lactato de potasio. El resultado que obtuvo fue carne más oscura que el control, pero con mayor estabilidad del color, además de mejorar considerablemente la apariencia visual de la carne.

Comercialmente hay disponibles productos de lactato con tres diferentes cationes (calcio, potasio y sodio). Últimamente estos productos se han utilizado en productos cárnicos obteniendo un balance entre costo y funcionalidad. Los lactatos muestran propiedades antimicrobianas en contra de microorganismos no patógenos (Chen & Shelef, 1992) y patógenos (Millar & Acuff, 1994). Además, el lactato anión, parece que promueve la estabilidad del color, por eso este ingrediente por sí solo podrá actuar tanto en la seguridad como en la calidad del producto. Una solución de lactato de calcio mejora la calidad de la carne al incrementar la estabilidad del color y disminuir la formación de metamioglobina (Lawrence et al., 2004) al igual que el lactato de potasio (Mancini et al. 2005). Pero, utilizando lactato de potasio la apariencia de la carne se oscurece y disminuye la luminosidad de la carne (valor  $L^*$ ) (Kim et al., 2005; Mancini et al., 2005; Wagner et al., 2006).

El tratamiento que contenía la combinación de nisina y ácidos orgánicos (en la primera etapa) resultó el más eficaz para mantener un pH apropiado, pues logra colocarlo en valores por debajo de 5.5 durante los 10 días de almacenamiento. No así los demás tratamientos, que presentan un comportamiento muy similar entre ellos pero diferente al de la combinación de nisina con ácidos orgánicos. En la segunda etapa del estudio, el tratamiento con nisina y ácidos orgánicos también consiguió ser el más eficaz, ya que logró

mantener un pH apropiado para el control microbiológico, pues lo colocó en valores por debajo de 5.5 durante los 10 días de almacenamiento del producto. Los tratamientos con lactato de sodio, acetato-lactato y lactato de potasio presentaron una estabilización en sus valores entre 5.6 a 5.8, y al día 8 estos valores disminuyeron hasta alcanzar un pH de 5.3 en los 3 tratamientos. Pawar (2000), encontró que la aplicación de nisina en muestras de carne molida de búfalo, logró una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ) del pH, en comparación con las muestras control, en temperatura de refrigeración. En un estudio realizado por Drosinos (2006), en el que empleó lactato de sodio a diferentes concentraciones, se observó el buen control del pH durante el periodo de análisis, al adicionar el lactato. Tan (2002) en su estudio con lactatos adicionados a carne de cerdo no encontró alteraciones significativas en cuanto al cambio de pH, ya que según lo describe se mantuvo uniforme durante el experimento.

Al observar los datos obtenidos en lo relacionado al análisis microbiológico, de color y pH, podemos ver la buena interacción que tuvo el antimicrobiano que contenía nisina y ácidos orgánicos, pues al lograr un efectivo control microbiológico se evitó una alta proliferación de bacterias, lo que repercutió de manera positiva sobre un nivel de pH bajo y finalmente nos llevo a obtener muy buenos niveles de claridad en la carne.

Las características sensoriales de los alimentos más importantes para el consumidor, incluyen textura, sabor, aroma y color (Aktas & Kaya, 2001), varias de estas características varían de acuerdo al tipo de carne, particularmente la palatabilidad. El consumidor ha identificado a la suavidad como el atributo sensorial más importante de la carne (Boleman et al., 1995; Miller et al., 1995).

El tratamiento antimicrobiano que obtuvo el menor nivel de aceptación por parte de los panelistas fue el que contenía la combinación de nisina y ácidos orgánicos en su formulación, y también fue el único tratamiento diferente estadísticamente ( $P < 0.05$ ) en comparación con los demás. De manera muy diferente podemos ver que el tratamiento con el mayor nivel de aceptación por el panel fue el que no contenía ningún antimicrobiano (control) para su elaboración.

Muestras de carne de cerdo tratadas con lactatos, Jensen 2003, mostraron ser más tiernas y jugosas, y con mejor sabor, que las muestras control. El estudio realizado por Knock 2006, con carne de cerdo adicionada con lactato de potasio, demostró que este producto puede mejorar los atributos sensoriales del alimento. Friedrich 2008, encontró que al tratar albóndigas de res con lactato de potasio, obtenía mejores propiedades sensoriales con respecto al control.

En cuanto a la textura, la hamburguesa que tuvo el menor valor fue la del tratamiento que contenía lactato de sodio (LNa). Otra vez se encontró al tratamiento control como el más aceptado en lo que respecta a este parámetro, en comparación con las hamburguesas que contenían algún antimicrobiano.

Estadísticamente se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos control, el que contenía la combinación de nisina con ácidos orgánicos y el lactato de sodio. En lo que respecta al aspecto general de las hamburguesas, el tratamiento antimicrobiano con menor nivel de aceptación por parte del grupo de panelistas fue el que contenía la combinación de nisina y ácidos orgánicos, así como también podemos ver que fue el único tratamiento que presentó diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en comparación con los demás. De igual manera podemos volver a ver que el tratamiento mejor posicionado fue el que carecía de antimicrobiano en su elaboración. Los demás tratamientos se comportaron de manera similar ya que fueron iguales estadísticamente.

Se concluye que de los cuatro tratamientos analizados, el que contenía la combinación de nisina y ácidos orgánicos dio al producto cárnico un adecuado control sanitario durante el periodo de almacenamiento. De igual forma los valores de color y pH de la carne se mantuvieron uniformes. Cabe mencionar que aunque este antimicrobiano fue el que mejor protección microbiológica confirió al producto cárnico, fue el menos aceptado en la prueba sensorial. Por lo que cabría la posibilidad de trabajar diferentes combinaciones y concentraciones de este y los demás antimicrobianos para de esta forma obtener un producto con sabor aceptable y un control sanitario adecuado.

Estos resultados permiten afirmar que el uso de productos que le puedan conferir una protección extra al procesado cárnico, siempre se deberán tomar en cuenta, pues además de proporcionar seguridad sanitaria y un buen aspecto durante su vida de anaquel al consumidor final, se le podrá dar un valor agregado.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Adams M.R. & M.O. Moss. Microbiología de los alimentos; Edit. Acribia, Zaragoza España, 1997
- Aktas, N., & Kaya, M. (2001). The influence of marinating with weak organic acids and salts on the intramuscular connective tissue and sensory properties of beef. *European Food Research and Technology*, 213(2), 88–94.
- Alan H. Varman. Meat and Meat products. Technology, chemistry and microbiology (food Products series 3). Chapman and Hall. Inglaterra. 1989.
- Alan H., Jane P. Carne y productos cárnicos. Zaragoza. Ed. Acribia. 1995.
- Andersen L. Preservation of meat products with a Lactic Acid Bacteria culture-FloraCarn L-2. 1995. Proceedings of the 41<sup>st</sup> International Congress of Meat Science and Technology. San Antonio, Texas, USA. August 20-25. Ed. AMS and ICoMST. Vol II. Pag. 303-304.
- Atlas R.M, Bartha R. Ecología Microbiana y Microbiología ambiental 4<sup>o</sup> edición; Edit. Addison Wesley, Madrid España, 2002
- Aymerich T., Picouet P. A. y Monfort J. M. (2008). Decontamination technologies for meat products. *Meat Science*, 78:114-129.
- Aymerich, M. T., Jofré, A., Garriga, M., & Hugas, M. (2005). Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by natural antimicrobials and high hydrostatic pressure in sliced cooked ham. *Journal of Food Protection*, 68, 173–177.
- Aymerich, M.A. y Hugas, M. (1998). Estado actual de la bioconservación en productos cárnicos. *Eurocarne*, 72: 39-51.
- Bedie, G. K., Samelis, J., Sofos, J. N., Belk, K. E., Scanga, J. A., & Smith, G. C. (2001). Antimicrobials in the formulation to control *Listeria monocytogenes* postprocessing contamination on frankfurters stored at 4°C in vacuum packages. *Journal of Food Protection*, 64, 1949–1955.

- Bjorkroth, J, and Korkeala, H. 1997. Ropy slime-producing *Lactobacillus sake* strains possess a strong competitive ability against a commercial biopreservative. *Int. J. Food Microbiol.* 38, 117-123.
- Boleman, S. J., Boleman, S. L., Bidner, T. D., McMillin, K. W., & Monlezun, C. J. (1995). Effects of postmortem time on calcium chloride injection on beef tenderness and drip, cooking, and total loss. *Meat Science*, 39(1), 35–41.
- 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.
- Brewer, M. S., Rostogi, B. K., Argoudelis, L., & Sprouls, G. R. (1995). Sodium lactate/sodium chloride effects on aerobic plate counts and color of aerobically packaged ground pork. *Journal of Food Science*, 60, 58–62.
- Campos JA. 2002. Cultivos Probióticos y Protectores, Propiedades Funcionales (Nutraceuticas) de Valor Agregado en los Derivados Lácteos. *Lácteos y Cárnicos Mexicanos*. Jun/Jul 26-37.
- Casp A., Requena J. *Procesos de conservación de alimentos*. 2a ed. Madrid: ed. Mundi-Prensa, 2003
- Chen, N & Shelef, L.A. (1992). Relationship between water activity, salts of lactic acid, and growth of *Listeria monocytogenes* in a meat model system. *Journal of Food Protection*. 55(8), 574-578.
- Cleveland J., Montville T.J., Nes I.F. & Chikindas M.L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71, 1-20.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I.F. & Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiologia* 71, 1-20.
- 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.

- Cotter, P.D., Hill, C. y Ross, R.P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Microbiology Reviews*, 3: 777-788.
- Cubina I., 'Natural sodium and potassium lactates, the versatile ingredients for the meat and fish industry', p109-117. 2001.
- Cutter, C. N., & Siragusa, G. R. (1994). Efficacy of organic acids against *Escherichia coli* O157:H7 attached to beef carcass tissue using a pilot scale model carcass washer. *Journal of Food Protection*, 57, 97–103.
- Daeschel M.A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives, *Food Technology* 43.
- Delves-Broughton J. 1990. Nisin and its use as a food preservative. *Food Technol.* 44: 100-112.
- Drosinos Eleftherios H., Marios Mataragas, Aikaterini Kampani, Dimitrios Kritikos Ioannis Metaxopoulos (2006). Inhibitory effect of organic acid salts on spoilage flora in culture medium and cured cooked meat products under commercial manufacturing conditions. *Meat Science*. 73 (75-81).
- Duxbury, D. D. (1990). Sodium lactate extends shelf life, improves flavor of cooked beef. *Food Processing*, 46–47.
- European Parliament and of the Council (1995). European Directive 95/2/ CE relative to food additives other than colors and sweeteners. *Official Journal*, L61, 1–40.
- Farnworth ER. 2001. Probiotics and prebiotics. En *Handbook of Nutraceutical and functional foods* [RE Wildman ] Ed. CRC Press. Cap. 25: 407 – 422.
- FOCUS, *Processed Fresh Meats*, PURAC, 2000.
- *Foodtech asia*, 'Lactates controls shelf life and safety in processed meat', 4/4 1999.
- Friedrich L., Siró I., Dalmadi I., Horváth K., Agoston R., Balla Cs. (2006). Influence of various preservatives on the quality of minced beef under modified atmosphere at chilled storage. *Meat Science*. 74: 319-326.
- Garriga M *et. al.* 2001. *Eurocarne* 96, 67-71.



- Garriga, M, Aymerich MT, Costa S, Monfort JM and Hugas M. 2001. Bacterias lácticas para evitar la viscosidad en productos cárnicos cocidos loncheados. Un ejemplo de bioprotección. *Eurocarne* 96, 67-71.
- Glass, K. A., Granberg, D. A., Smith, A. L., McNamara, A. M., Hardin, M., Mattias, J., et al. (2002). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by sodium diacetate and sodium lactate on wieners and cooked bratwurst. *Journal of Food Protection*, 65, 116–123.
- Goldberg M. *Biotechnology and food ingredients*. EUA: VNR, 1991.
- Guarner F. 2000. El colon como órgano: habitat de la flora bacteriana *Alimentación Nutrición y Salud* 7 (4) 99-106.
- Guarner F. and JR Malagelada. 2002. Ecología Intestinal: Modulación mediante probióticos. En *Alimentos Funcionales. Probióticos*. [RM Ortega, A Marcos, J Aranceta, JA Mateos, AM Requejo, L Serra] Ed. Médica Panamericana. Cap 4.
- Guerrero I., y Arteaga, M.R.(1990). *Tecnología de carnes: Elaboración y preservación de productos cárnicos*. Ed. Trillas, México. pp: 15-30.
- 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.
- 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.
- Horst-Dieter T. *Fundamentos de tecnología de los alimentos*. Zaragoza: ed. Acribia, 2001.
- Houtsma P., *The antimicrobial activity of sodium lactate*, PURAC, 1996.
- Hugas, M, Garriga, M, Aymerich MT y Monfort, JM. 1995. Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. *J. Appl. Bacteriol.* 79, 322-330.
- Hugas, M, Pagés, F, Garriga, M y Monfort, JM. 1998. Application of the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494 to prevent growth of

Listeria in fresh and cooked meat products packed with different atmospheres. *Food Microbiol.* 15, 639-650.

- Hugas, M. (1998). Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria for the Biopreservation of Meat and Meat Products. *Memorias del 44'h ICoMST*, Barcelona, España.
- Jelle, B. 1987. The preserving effect of lactobacilli on vacuum-packed beef. Master thesis. Royal Veterinary & Agricultura University, Copenhagen.
- Jelle, B. 1991. Biopreservation of sliced meat products.
- Jensen, J.M., Robbins, K.L., Ryan K.J., Homco-Ryan, C., McKeith, F.K. y Brewer M.S. (2003). Effects of lactic and acetic acid salts on quality characteristics of enhanced pork during retail display. *Meat Science.* 63:501-508.
- 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.
- Kim, Y., Hunt, M.C., Mancini, R.A., Kropf, D. & Smith, J.S. (2005). Metmyoglobin reduction through lactate-NAD-LDII system *in vivo* and *in vitro*. In *Proceedings International Congress of Meat Science Technology*, 7-12 August 2005, Baltimore, MD, USA.
- Klenhamer TR 1993. Genetics of bacteriocin produced by lactic acid bacteria *FEMS Microbiol Rev.* 12: 39-86.
- Knock R.C., Seyfert M., Hunt M.C., Dikeman M.E., Mancini R.A., Unruh J.A. Higgins J.J., Monderen R.A. (2006). Effects of potassium lactate, sodium chloride, sodium tripolyphosphate, and sodium acetate on colour, colour stability, and oxidative properties of injection-enhanced beef rib steaks. *Meat Science.* 74:312-318.
- Knock R.C., Seyfert M., Hunt M.C., Dikeman M.E., Mancini R.A., Unruh J.A. Higgins J.J., Monderen R.A. (2006). Effects of potassium lactate, sodium chloride, and sodium acetate on surface shininess/gloss and sensory properties of injection-enhanced beef strip-loin steaks. *Meat Science.* 74:319-326.

- Koos de J.T., 'Sodium and potassium lactate, A natural way to improve processed meat quality', *Agro-food-industry Hi-tech*, May/June (1992).
- Kotzekidou, P, and Bloukas, JG. 1996. Effect of protective cultures and packaging film permeability on shelf-life of sliced vacuum-packaged cooked ham. *Meat Sci.* 42, 333-345.
- Kroeckel L and Schmidt U. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in vacuum packaged sliced Bruehwurst by bacteriocin forming protective cultures. *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt fuer Fleischforschung Kulmbach*, 33 (126) pag 428-435.
- Lawrence, T. E., Dikeman, M. E., Hunt, M. C., Kastner, C. L., & Johnson, D. E. (2004). Effects of enhancing beef longissimus with phosphate plus salt, or calcium lactate plus non-phosphate water binders plus rosemary extract. *Meat Science*, 67(1), 129–137.
- Lück E. and M. Jager, *Antimicrobial Food Additives*, 1997.
- Lücke F. (2000). Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Sci.*, 56(2000):105-115.
- Mancini, R. A., Hunt, M. C., Hachmeister, K. A., Seyfert, M., Kropf, D. H., Johnson, D. E., Cusick, S., & Morrow, C. (2005). The utility of lactate and rosemary in beef enhancement solutions: effects on longissimus color changes during display. *Journal of Muscle Foods*, 16(1), 27–36.
- Marteau P, M. Vrese, CJ Cellier and J. Schrezenmeir 2001. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics *Am J Clin Nut* 73 (suppl) 430-436.
- Mateos JA. 2002. Aspectos Básicos de la Tecnología de las Leches Fermentadas. En *Alimentos Funcionales. Probióticos*. [RM Ortega, A Marcos, J Aranceta, JA Mateos, AM Requejo, L. Serra.] Ed. Médica Panamericana. Cap 6.
- Mbandi, E., & Shelef, L. A. (2001). Enhanced inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* in meat by combinations of sodium lactate and diacetate. *Journal of Food Protection*, 64, 640–644.

- McMullen, L.M. y Stiles, M.E. (1996). Potential Use of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria in Preservation of Meats. *J. Food Prot. Supl.* 64-71.
- Meilgaard, M.; C.V. Civille. and B.T. Carr 1999. Sensory evaluation techniques, 3<sup>rd</sup> ed., CRC Press, Florida. 553 pp.
- Miller, M. F., Huffman, K. L., Gilbert, S. Y., Hamman, L. L., & Ramsey, C. B. (1995). Retail consumer acceptance of beef tenderized with calcium chloride. *Journal of Animal Science*, 73(8), 2308–2314.
- Miller, R.K. & Acuff, G.R. (1994). Sodium lactate affects pathogens in cooked beef. *Journal of Food Science*. 59(1): 15-19.
- Mossel & Moreno García. *Microbiología de los alimentos*; Edit. Acribia, Zaragoza España, 1982
- Muriana P.M. 1996. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. In food. *Journal of Food Protection Supplement*. 54-63.
- Muriana, P. M. (1996) Bacteriocins for control of *Listeria* spp in food. *Journal of Food Protection Supplement*. 54-63.
- Murray, M., & Richard, J. A. (1997). Comparative study of the antilisterial activity of nisin and pediocin Ach in fresh ground pork stored aerobically at 5°C. *Journal of Food Protection*, 60, 1534–1540.
- Nes IF, DB Diep, LS Havarstein, Mi Brurberg, V Eijsink and H Holo 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 70 (2) 113-128.
- 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.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-034-SSA1-1993, Bienes y Servicios. Productos de la Carne. Carne Molida y Carne Molida Moldeada. Envasadas. Especificaciones Sanitarias.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-092-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-110-SSA1-1994 Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-113-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la Cuenta de Microorganismos Coliformes Totales en Placa.
- Norma Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2002, Productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
- Palou A. and F. Serra 2000. Perspectivas europeas sobre los alimentos funcionales. Alimentación Nutrición y Salud 7 (3) 76-90.
- Pawar, D. D., Malik, S. V. S., Bhilegaonkar, K. N., & Barbuddhe, S. B. (2000). Effect of nisin and its combination with sodium chloride on the survival of *Listeria monocytogenes* added to raw buffalo meat mince. Meat Science, 56, 215–219.
- Pérez-Alvarez, J.A., Fernández López J., y Sayas, Barberh E., (2000). Fundamentos físico-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 Alvares y Fernández López J. Universidad Miguel Hernández España y Universidad Nacional del Litoral, Argentina, pp 11-39.
- Porto, A. C. S., Franco, B. D. G. M., Sant'Anna, E. S., Call, J. E., Piva, A., & Luchansky, J. B. (2002). Viability of a five-strain mixture of *Listeria monocytogenes* in vacuum-sealed packages of frankfurters, commercially prepared with and without 2.0 or 3.0% added potassium lactate, during extended storage at 4 and 10 °C. Journal of Food Protection, 65, 308–315.
- Prandl O., Fischer A., Hands-Jurgen T. Tecnología e higiene de la carne. Zaragoza: ed. Acribia, 1999.
- Price J.F., Schweigert B.S. Ciencia de la carne y de los productos cárnicos 2ª ed. Zaragoza: ed. Acribia. 2001.
- PURAC<sup>1</sup>, *Education Kit on food acids*, 2000.
- PURAC<sup>2</sup>, *meat & poultry: improving your product*, 2000.
- PURAC<sup>3</sup>, *Lactate and diacetate in food*, PURAC, 1997 (intern by purac central laboratory).

- PURAC<sup>4</sup>, information flyer, *Lactic acid and lactates*, September 2001.
- PURAC<sup>5</sup>, *Purasal lactates*, rev.no.1 2000.
- PURAC<sup>6</sup>, Intern application data, *PURASAL P HiPure 60*, , 2000.
- PURAC<sup>7</sup> America inc., 'Lactate controls Listeria', *Meat processing*, May 1999.
- PURAC<sup>8</sup> America, 'Lactates control Listeria in meat products', *Food product design*, may 1999.
- Reichert J.E. Ciencia y tecnología de los alimentos. Zaragoza: ed. Acribia, 2000.
- Saavedra JM. 2001. Clinical applications of probiotic agents Am J Clin Nut 73 (suppl) 1147-1151.
- Sablon E, B. Contreras and E. Vandamme 2000. Antimicrobial peptides of Lactic Acid Bacteria: Mode of Action, Genetic and Biosynthesis. In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. [Th. Scheper] Springer –Verlag.
- Sallam, K. I., & Samejima, K. (2004). Microbiological and chemical quality of ground beef treated with sodium lactate and sodium chloride during refrigerated storage. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 37, 865–871.
- Samelis, J., Bedie, G. K., Sofos, J. N., Belk, K. E., Scanga, J. A., & Smith, G. C. (2002). Control of *Listeria monocytogenes* with combined antimicrobials after postprocess contamination and extended storage of frankfurters at 4°C in vacuum packages.. *Journal of Food Protection*, 65, 299–307.
- Sanders ME. 2000. Considerations for Use of probiotic bacteria to modulate human health J. Nut 130 384S-390S.
- Scannell, A. G. M., Hill, C., Buckley, D. J., & Arendt, E. K. (1997). Determination of the influence of organic acids and nisin on shelf-life and microbiological safety aspects of fresh pork sausage. *Journal of Applied Microbiology*, 83, 407–412.
- Schrezenmeir, J. and M. Vrese. 2001. Probiotics, prebiotics, and symbiotic-approaching a definition. Am J Clin Nut 73 (suppl) 361-364.

- Seman, D. L., Borger, A. C., Meyer, J. D., Hall, P. A., & Milkowski, A. L. (2002). Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* in cured ready-to-eat meat products by manipulation of sodium chloride, sodium diacetate, potassium lactate, and product moisture content. *Journal of Food Protection*, 65, 651–658.
- Seyfert, M., Hunt, M. C., Ahnstrom, M. L., & Johnson, D. E. (2007). Efficacy of lactic acid salts and sodium acetate on ground beef colour stability and metmyoglobin-reducing activity. *Meat Science*, 75, 134–142.
- Shelef, L. A. (1994). Antimicrobial effects of lactates. *Journal of Food Prot*, 57, 445–450.
- Shelef, L. A., & Potluri, V. (1995). Behaviour of foodborne pathogens in cooked liver sausage containing lactates. *Food Microbiology*, 12, 221–227.
- Situación actual y perspectiva de la producción de carne de bovino en México 2006. SECOFI, BANXICO, SAGARPA, 2006.
- Smulders F.J.M., *Elimination of Pathogenic Organisms from Meat and Poultry*, Elsevier Science Publishers bv, 1987.
- Solomakos, N. et al, (2008). The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *E. Coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. *Meat Science*, Article in press.
- Stiles ME. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhock*.70:331-345.
- Tan W.y Shelef L.A. (2002). Effects of sodium chloride and lactates on chemical and microbiological changes in refrigerated and frozen fresh ground pork. *Meat Science*. 62:27-32.
- Tolboom H., The minimum inhibitory concentration (MIC) of sodium lactate, sodium acetate, sodium diacetate and tri-sodium citrate for spoilage micro-organisms and pathogens and the growth of these micro-organisms with combinations of sodium lactate and sodium acetate, Wageningen Agriculture University and PURAC biochem bv, 1997.
- United States Department of Agriculture —Federal Safety Inspection Service. (1993, January 13 ). *Federal register* 58 (pp. 4067–4070).

- Urbain W.M. Campbell J.F. La conservación de la carne. Zaragoza: ed. Acribia, 1999.
- Verdugt, *Applications of (sodium) diacetate in food*, 1997.
- Wagner, R.C., Seyfert, M., Hunt, M.C., Dikerman, M.E., Mancini, R.A., et al. (2006). Effects of potassium lactate, sodium chloride, sodium tripolyphosphate and sodium acetate on colour, colour stability and oxidative properties of injection-enhanced beef rib steaks. *Meat Science*. 74(2): 312-318.
- Wayne State University, Department of Nutrition and Food Science, 'Enhanced Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritis* in Meat by Combinations of Sodium Lactate and Diacetate', *Journal of Food Protection*, vol.64/no5 (2001), p 640-644.
- Wheeler, T.L., Koohmaraie, M.L., and sdell, 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.
- Won PS, Hyun SK, Han SJ, Joo LH. 2001 High hydrostatic pressure inactivation of *Lactobacillus viridescens* and its effects on ultrastructure of cells. *International Journal of Food Science and Technology*, 36 (7), pag. 775-781.
- Wong P.C. *Química de los alimentos: mecanismos y teorías*. Zaragoza: ed. Acribia, 1994.
- Yang R. & Ray R. 1994. Prevalence and biological control of bacteriocin-producing psychrotrophic *Leuconostocs* associated with spoilage of vacuum-packaged processed meats. *Journal of Food Protection* 57, 209-217.
- Yang, R & Ray, R. (1994). Prevalence and biological control of bacteriocins-producing psychrotrophic *Lueconostoes* associated with spoilage of vacuum-packaged processed meats. *Journal of Food Protection* 57:209-217.
- Zamora, M.B. y Zaritzky N.E. (1985). Modeling of microbial growth in refrigerated packaged beef. *J. FoodSci.*, 50:1003-1013.



- Zeitoun, A.A.M., Debevere, J.M., y Mossel, .D.A.A. (1 994). Significance of Enterobacteriaceae as index organisms for hygiene on fresh untreated poultry, poultry treated with lactic acid and poultry stored in modified atmosphere. *Food Microbial.* 1 1 : 169-1 76

## **ANEXOS**

- **ANEXO A. CUESTIONARIO EVALUACIÓN SENSORIAL DE CARNE DE RES.**
- **ANEXO B. FICHAS TECNICAS ANTIMICROBIANOS.**

## ANEXO A

### CUESTIONARIO EVALUACIÓN SENSORIAL DE CARNE DE RES

Gracias por su participación en este estudio. El objetivo de este estudio es evaluar carne de RES. Por favor tómese el tiempo que necesite y evalúe cuidadosamente las muestras que se les irán proporcionando. **Su ayuda y sus opiniones serán de valiosa ayuda en nuestro estudio.** Por favor indique su **Edad:** \_\_\_\_\_ **Sexo:** \_\_\_\_\_ **Ocupación:** \_\_\_\_\_

#### A PARTIR DE AHORA COMIENZA LA EVALUACIÓN SENSORIAL

Va a tener dos platos consecutivos. Habrá 3 muestras de carne de res en cada plato. Primero toma un poco de agua para enjuagarte la boca. Luego prueba la primera muestra y contesta en las escalas lo que se te pregunta.

MUESTRA 006

#### ¿Como te gusta el SABOR de esta muestra?

Disgusta extremadamente	Disgusta Ligeramente	Disgusta Muy poco	Gusta Ni mucho ni poco	Gusta Ligeramente	Gusta Mucho	Gusta extremadamente
-------------------------	----------------------	-------------------	------------------------	-------------------	-------------	----------------------

#### ¿Como te gusta la TEXTURA de esta muestra?

Disgusta extremadamente	Disgusta Ligeramente	Disgusta Muy poco	Gusta Ni mucho ni poco	Gusta Ligeramente	Gusta Mucho	Gusta extremadamente
-------------------------	----------------------	-------------------	------------------------	-------------------	-------------	----------------------

#### ¿Como te gusta en GENERAL esta muestra?

Disgusta extremadamente	Disgusta Ligeramente	Disgusta Muy poco	Gusta Ni mucho ni poco	Gusta Ligeramente	Gusta Mucho	Gusta extremadamente
-------------------------	----------------------	-------------------	------------------------	-------------------	-------------	----------------------

Ahora toma agua de nuevo y una galleta. Ahora prueba la segunda muestra y contesta.

MUESTRA 338

#### ¿Como te gusta el SABOR de esta muestra?

Disgusta extremadamente	Disgusta Ligeramente	Disgusta Muy poco	Gusta Ni mucho ni poco	Gusta Ligeramente	Gusta Mucho	Gusta extremadamente
-------------------------	----------------------	-------------------	------------------------	-------------------	-------------	----------------------

#### ¿Como te gusta la TEXTURA de esta muestra?

Disgusta extremadamente	Disgusta Ligeramente	Disgusta Muy poco	Gusta Ni mucho ni poco	Gusta Ligeramente	Gusta Mucho	Gusta extremadamente
-------------------------	----------------------	-------------------	------------------------	-------------------	-------------	----------------------

#### ¿Como te gusta en GENERAL esta muestra?

Disgusta extremadamente	Disgusta Ligeramente	Disgusta Muy poco	Gusta Ni mucho ni poco	Gusta Ligeramente	Gusta Mucho	Gusta extremadamente
-------------------------	----------------------	-------------------	------------------------	-------------------	-------------	----------------------

Ahora toma agua de nuevo y otra galleta. Ahora prueba la segunda muestra y contesta.

MUESTRA 231

#### ¿Como te gusta el SABOR de esta muestra?

Disgusta extremadamente	Disgusta Ligeramente	Disgusta Muy poco	Gusta Ni mucho ni poco	Gusta Ligeramente	Gusta Mucho	Gusta extremadamente
-------------------------	----------------------	-------------------	------------------------	-------------------	-------------	----------------------

#### ¿Como te gusta la TEXTURA de esta muestra?

Disgusta extremadamente	Disgusta Ligeramente	Disgusta Muy poco	Gusta Ni mucho ni poco	Gusta Ligeramente	Gusta Mucho	Gusta extremadamente
-------------------------	----------------------	-------------------	------------------------	-------------------	-------------	----------------------

**¿Como te gusta en GENERAL esta muestra?**

Disgusta extremadamente	Disgusta Ligeramente	Disgusta Muy poco	Gusta Ni mucho ni poco	Gusta Ligeramente	Gusta Mucho	Gusta extremadamente
----------------------------	-------------------------	----------------------	---------------------------	----------------------	----------------	-------------------------

Ahora toma agua de nuevo y otra galleta. Ahora prueba la segunda muestra y contesta.

MUESTRA 236

**¿Como te gusta el SABOR de esta muestra?**

Disgusta extremadamente	Disgusta Ligeramente	Disgusta Muy poco	Gusta Ni mucho ni poco	Gusta Ligeramente	Gusta Mucho	Gusta extremadamente
----------------------------	-------------------------	----------------------	---------------------------	----------------------	----------------	-------------------------

**¿Como te gusta la TEXTURA de esta muestra?**

Disgusta extremadamente	Disgusta Ligeramente	Disgusta Muy poco	Gusta Ni mucho ni poco	Gusta Ligeramente	Gusta Mucho	Gusta extremadamente
----------------------------	-------------------------	----------------------	---------------------------	----------------------	----------------	-------------------------

**¿Como te gusta en GENERAL esta muestra?**

Disgusta extremadamente	Disgusta Ligeramente	Disgusta Muy poco	Gusta Ni mucho ni poco	Gusta Ligeramente	Gusta Mucho	Gusta extremadamente
----------------------------	-------------------------	----------------------	---------------------------	----------------------	----------------	-------------------------

Ahora toma agua de nuevo y otra galleta. Ahora prueba la segunda muestra y contesta.

MUESTRA 987

**¿Como te gusta el SABOR de esta muestra?**

Disgusta extremadamente	Disgusta Ligeramente	Disgusta Muy poco	Gusta Ni mucho ni poco	Gusta Ligeramente	Gusta Mucho	Gusta extremadamente
----------------------------	-------------------------	----------------------	---------------------------	----------------------	----------------	-------------------------

**¿Como te gusta la TEXTURA de esta muestra?**

Disgusta extremadamente	Disgusta Ligeramente	Disgusta Muy poco	Gusta Ni mucho ni poco	Gusta Ligeramente	Gusta Mucho	Gusta extremadamente
----------------------------	-------------------------	----------------------	---------------------------	----------------------	----------------	-------------------------

**¿Como te gusta en GENERAL esta muestra?**

Disgusta extremadamente	Disgusta Ligeramente	Disgusta Muy poco	Gusta Ni mucho ni poco	Gusta Ligeramente	Gusta Mucho	Gusta extremadamente
----------------------------	-------------------------	----------------------	---------------------------	----------------------	----------------	-------------------------

Ahora toma agua de nuevo y otra galleta. Ahora prueba la segunda muestra y contesta.

MUESTRA 155

**¿Como te gusta el SABOR de esta muestra?**

Disgusta extremadamente	Disgusta Ligeramente	Disgusta Muy poco	Gusta Ni mucho ni poco	Gusta Ligeramente	Gusta Mucho	Gusta extremadamente
----------------------------	-------------------------	----------------------	---------------------------	----------------------	----------------	-------------------------

**¿Como te gusta la TEXTURA de esta muestra?**

Disgusta extremadamente	Disgusta Ligeramente	Disgusta Muy poco	Gusta Ni mucho ni poco	Gusta Ligeramente	Gusta Mucho	Gusta extremadamente
----------------------------	-------------------------	----------------------	---------------------------	----------------------	----------------	-------------------------

**¿Como te gusta en GENERAL esta muestra?**

Disgusta extremadamente	Disgusta Ligeramente	Disgusta Muy poco	Gusta Ni mucho ni poco	Gusta Ligeramente	Gusta Mucho	Gusta extremadamente
----------------------------	-------------------------	----------------------	---------------------------	----------------------	----------------	-------------------------



## Product data

Rev.No.2/2011

### PURASAL<sup>®</sup>S

#### Description

PURASAL S is the sodium salt of natural L(+)-lactic acid, produced by fermentation of sugar. It has a mild saline taste, antimicrobial properties and is neutral by pH. PURASAL S is a clear liquid solution. L-sodium lactate is soluble in water.

PURASAL S is the ultra pure food grade L-sodium lactate.

#### Specification

Product Form	L-sodium lactate liquid
--------------	-------------------------

#### Assay

Assay	58.8-61.2% w/w
Assay sodium	12.1-12.6% w/w
Density at 20°C	1.32-1.34 g/ml

#### Visual sensoric characteristics

Color fresh	max. 25 Apha
Odor	passes test

#### Identification

Identification of sodium and lactate	passes test
Stereochemical purity (L-isomer)	min. 95%

#### Purity

Cyanide	max. 0.3 ppm
Lead	max. 2 mg/kg
Citrate, oxalate, phosphate, tartrate	passes test
Sugars	passes test
Methanol and methyl esters	max. 0.025% w/w
Chloride	max. 0.03% w/w
Sulphate	max. 0.003 % w/w
pH (direct)	6.5-8.5
pH 10% (v/v)	6.0-7.5

#### Physical-chemical properties

Molecular formula	CH <sub>3</sub> CHOHCOONa
Molecular weight	112 (anhydrous)
Chemical name	Sodium L-2-hydroxy-propionate

#### Registration

CAS number	72-17-3
EEC additive number	E 325
USA	GRAS
Complies with	FCC

#### Packaging

PURASAL S is supplied in 210 L (55 gallon) polyethylene drums (275 kg, 606 lbs), 1000 L (264 gallon) semibulk containers (1315 kg, 2899 lbs) and bulk containers.

Copyright © PURAC. All rights reserved. No part of this publication may be copied, downloaded, reproduced, stored in a retrieval system or transmitted in any form by any means, electronic, mechanical, photocopied, recorded or otherwise, without permission of the publisher. No representation or warranty is made as to the truth or accuracy of any data, information or opinions contained herein or as to their suitability for any purpose, condition or application. None of the data, information or opinions contained herein may be relied upon for any purpose or reason. PURAC disclaims any liability, damages, losses or other consequences suffered or incurred in connection with the use of the data, information or opinions contained herein. In addition, nothing contained herein shall be construed as a recommendation to use any products in conflict with existing patents covering any material or its use.

For further information:

<http://www.purac.com/>

Page 1 of 1



## Nutritional data

Rev No: 3/3002-3003-3009-3101-3102-3103

### Nutritional information\* per 100 gram product

		PURASAL <sup>®</sup> 60% <sup>°</sup>	
		PURASAL S	PURASAL P
Calories	(kCal)	172	150
	(kJ)	718	628
Calories from fat	(kCal)	0	0
Protein	(g)	0	0
Total carbohydrates	(g)	47.7	41.7
Complex carb.	(g)	0	0
Simple sugars	(g)	0	0
Other carb. <sup>1</sup>	(g)	47.7	41.7
Fat	(g)	0	0
Saturated fat	(g)	0	0
Unsaturated fat	(g)	0	0
Cholesterol	(mg)	0	0
Dietary fiber	(g)	0	0
Soluble fiber	(g)	0	0
Insoluble fiber	(g)	0	0
Sodium	(mg)	12400	100
Potassium	(mg)	90	18500
Calcium	(mg)	0	0
Iron	(mg)	0	0
Vitamin A	(mg)	0	0
Thiamin (Vit. B1)	(mg)	0	0
Riboflavin (Vit. B2)	(mg)	0	0
Niacin (Vit. B3)	(mg)	0	0
Vitamin C	(mg)	0	0

\* These values are measured or based on specifications but can vary slightly. They should be considered as typical values

<sup>°</sup> This covers qualities FCC and HiPure

<sup>1</sup>100 gram lactic acid/lactate equals 360 kCal and 1 kCal is 4.18 kJ

Copyright © PURAC. All rights reserved. No part of this publication may be copied, downloaded, reproduced, stored in a retrieval system or transmitted in any form by any means, electronic, mechanical, photocopy, recorded or otherwise, without permission of the publisher. No representation or warranty is made as to the truth or accuracy of any data, information or opinions contained herein or as to their suitability for any purpose, condition or application. None of the data, information or opinions contained herein may be relied upon for any purpose or reason. PURAC disclaims any liability, damages, losses or other consequences suffered or incurred in connection with the use of the data, information or opinions contained herein. In addition, nothing contained herein shall be construed as a recommendation to use any products in conflict with existing patents covering any material or its use.

For further information:

<http://www.purac.com/>

Page 1 of 1



## SAFETY DATA SHEET

### Sodium-L- Lactate

REVISION DATE 20/11/06  
REF. SD0130/2006-01

#### 1. IDENTIFICATION OF THE SUBSTANCE / PREPARATION AND THE COMPANY / UNDERTAKING

# Product name	PURASAL® S	
Supplier	PURAC America, Inc. 111 Barclay Blvd. Lincolnshire, IL 60069 USA	PBR sínteses Praça Pio X, 15, 9º andar CEP 20.040-020 Rio de Janeiro Brazil
Telephone	(847) 634 6330	++55 21 203 2191
Fax	(847) 634 1992	++55 21 263 9288
Emergency Telephone:	<b>(800) 424 9300</b>	++55 21 263 7292
Supplier	PURAC biochem Arkelsedijk 46 NL-4206 AC Gorinchem The Netherlands	Purac bioquímica Gran Vial 19-25 E 08160 Montmelo Barcelona Spain
Telephone	++31 (0) 183 695695	++34 93 572 1016
Fax	++31 (0) 183 695604	++34 93 568 3955
Emergency Telephone	++31 (0) 183 695695	++34 93 568 6300 (Ext 222)

#### 2. COMPOSITION / INFORMATION ON INGREDIENTS

Chemical name of the substance	Sodium-L(-)-2-hydroxy propionate aqueous solution.
Synonyms	Sodium Lactate, Sodium-L(-)-2-hydroxy propionate
CAS-No. 867-56-1	EC-No 212-762-3

#### 3. HAZARDS IDENTIFICATION

Most important hazards	May cause eye irritation with susceptible persons.
------------------------	--

#### 4. FIRST AID MEASURES

General advice	Show this safety data sheet to the doctor in attendance. Move to fresh air.
Inhalation	
Skin contact	Wash off with plenty of water.
Eye contact	Rinse thoroughly with plenty of water, also under the eyelids.
Ingestion	Drink plenty of water.
Major effects of exposure	May cause eye irritation with susceptible persons.

#### 5. FIRE-FIGHTING MEASURES

Suitable extinguishing media	Water, carbon dioxide (CO2), foam.
Extinguishing media which must not be used for safety reasons	None.
Specific hazards	Burning produces irritant fumes.
Special protective equipment for firefighters	None.
Specific methods	Standard procedure for chemical fires.

Copyright © PURAC. All rights reserved. No part of this publication may be copied, downloaded, reproduced, stored in a retrieval system or transmitted in any form by any means, electronic, mechanical, photocopied, recorded or otherwise, without permission of the publisher. No representation or warranty is made as to the truth or accuracy of any data, information or opinions contained herein or as to their suitability for any purpose, condition or application. None of the data, information or opinions contained herein may be relied upon for any purpose or reason. PURAC disclaims any liability, damages, losses or other consequences suffered or incurred in connection with the use of the data, information or opinions contained herein. In addition, nothing contained herein shall be construed as a recommendation to use any products in conflict with existing patents covering any material or its use.

For further information:

<http://www.purac.com/>

Page 1 of 4



## SAFETY DATA SHEET

**Sodium-L- Lactate**

REVISION DATE 20/11/06  
REF. 9D0130/2006-01

**6. ACCIDENTAL RELEASE MEASURES**

**Personal precautions** Avoid contact with eyes.  
Use personal protective equipment.  
**Environmental precautions** No special environmental precautions required.  
**Methods for cleaning up** Flush with water.

**7. HANDLING AND STORAGE**

**Handling**  
**Technical measures/Precautions** No special technical protective measures required.  
**Safe handling advice** Handle in accordance with good industrial hygiene and safety practice.

**Storage**  
**Technical measures/** Keep tightly closed in a dry place.  
**Storage conditions** Avoid long storage times.  
**Packaging material** Steel and plastic packages.

**8. EXPOSURE CONTROLS / PERSONAL PROTECTION**

**Engineering measures to reduce exposure** Insure adequate ventilation, especially in confined areas.

**Control parameters** None.

**Personal protection equipment**

**Respiratory protection** Not applicable.

**Hand protection** Not applicable.

**Eye protection** Safety glasses.

**Skin and body protection** Not applicable.

**Hygiene measures** Handle in accordance with good industrial hygiene and safety practice.

**9. PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES**

**Form** aqueous solution  
**Color** light yellow  
**Odor** slight / none  
**pH** 6.5 - 8.5 (10 - 60% aqueous solution) @ 77°F (25°C)  
**Molecular Weight** not applicable  
**Boiling point/range** 221°F (105°C) (50% solution),  
230°F (110°C) (60% solution)  
**Decomposition temperature** >392°F(200°C)  
**Autoignition temperature** not applicable  
**Flash point** not applicable  
**Explosion limits** not applicable  
**Density** 1320 - 1340kg/m<sup>3</sup> @ 68°F (20°C) (60 % solution)  
**Solubility** Water solubility: completely soluble  
**Viscosity** 60 - 160 mPa.s @ 68°F (20°C)

Copyright © PURAC. All rights reserved. No part of this publication may be copied, downloaded, reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without permission of the publisher. No representation or warranty is made as to the truth or accuracy of any data, information or opinions contained herein or as to their suitability for any purpose, condition or application. None of the data, information or opinions contained herein may be relied upon for any purpose or reason. PURAC disclaims any liability, damages, losses or other consequences suffered or incurred in connection with the use of the data, information or opinions contained herein. In addition, nothing contained herein shall be construed as a recommendation to use any products in conflict with existing patents covering any material or its use.

For further information:

<http://www.purac.com/>

Page 2 of 4



**Sodium-L- Lactate**

REVISION DATE 20/11/06  
REF. SD0130/2006-01

**10. STABILITY AND REACTIVITY**

<b>Stability</b>	Stable at normal conditions.
<b>Materials to avoid</b>	None.
<b>Hazardous decomposition Products</b>	Carbon oxides.

**11. TOXICOLOGICAL INFORMATION**

<b>Acute toxicity</b>	Health injuries are not known or expected under normal use. LD50/intraperitoneal/rat = 2000 mg/kg LD50/oral/rat = 2000 mg/kg.
<b>Local effects</b>	May cause eye irritation with susceptible persons.
<b>Specific effects</b>	Based on tests with L-lactic acid and its salts, there is no evidence to suggest carcinogenic nor mutagenic properties from lactic acid itself nor from the lactate portion of its metal salts.
<b>Further information</b>	Natural product in the body.

**12. ECOLOGICAL INFORMATION**

<b>Mobility</b>	Completely soluble in water.
<b>Persistence / degradability</b>	Product is a salt of lactic acid which is readily biodegradable.
<b>Bioaccumulation</b>	Unlikely.
<b>Ecotoxicity</b>	Ecological injuries are not known or expected under normal use.(No effect on Daphnia @ 10g/l.)

**13. DISPOSAL CONSIDERATIONS**

<b>Waste from residues / unused products</b>	Can be disposed as waste water, when in compliance with local regulations. Can be landfilled or incinerated, when in compliance with local regulations.
<b>Contaminated packaging</b>	Clean container with water. Empty containers should be taken for local recycling, recovery or waste disposal.

**14. TRANSPORT INFORMATION**

Not classified as dangerous in the meaning of transport regulations.

Copyright © PURAC. All rights reserved. No part of this publication may be copied, downloaded, reproduced, stored in a retrieval system or transmitted in any form by any means, electronic, mechanical, photocopied, recorded or otherwise, without permission of the publisher. No representation or warranty is made as to the truth or accuracy of any data, information or opinions contained herein or as to their suitability for any purpose, condition or application. None of the data, information or opinions contained herein may be relied upon for any purpose or reason. PURAC disclaims any liability, damages, losses or other consequences suffered or incurred in connection with the use of the data, information or opinions contained herein. In addition, nothing contained herein shall be construed as a recommendation to use any products in conflict with existing patents covering any material or its use.

*For further information:*

<http://www.purac.com/>



## SAFETY DATA SHEET

**Sodium-L- Lactate**

REVISION DATE 20/11/06  
REF. 9D0130/2006-01

### 15. REGULATORY INFORMATION

#### US Regulations

TSCA Inventory Status: Y (Sodium Lactate)  
SARA III: N  
California Proposition 65: N  
Carcinogenic status: OSHA: N, NTP: N, IARC: N FDA: GRAS

#### EU Status

Not a hazardous substance or preparation according to EC-directives 67/548/EEC or 99/45/EC.  
EU Food additive (Sodium Lactate E325)

### 16. OTHER INFORMATION

**CAS-No.** 72-17-3 (general)

**EC-No** 200-772-0 (general)

**NFPA Ratings (Scale 0-4)**

0(health)-0(flammability)-0(reactivity)

**HMIS Rating**

0(health)-0(flammability)-0(reactivity)-A (protective equipment)

Further information on the safety assessment of sodium lactate and lactic acid can be obtained in a CFTA Report of June 6th 1997.

This information only concerns the above-mentioned product and is not valid if used with other product(s) or in any process. The information is to our best present knowledge correct and complete and is given in good faith but without warranty. It remains the user's own responsibility to make sure that the information is appropriate and complete for his special use of this product.

# indicates updated section.

Copyright © PURAC. All rights reserved. No part of this publication may be copied, downloaded, reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form by any means, electronic, mechanical, photocopied, recorded or otherwise, without permission of the publisher. No representation or warranty is made as to the truth or accuracy of any data, information or opinions contained herein or as to their suitability for any purpose, condition or application. None of the data, information or opinions contained herein may be relied upon for any purpose or reason. PURAC disclaims any liability, damages, losses or other consequences suffered or incurred in connection with the use of the data, information or opinions contained herein. In addition, nothing contained herein shall be construed as a recommendation to use any products in conflict with existing patents covering any material or its use.

For further information:

<http://www.purac.com/>

Page 4 of 4



## Product data

Rev.No.4/3109

### PURASAL<sup>®</sup> HiPure P Plus

#### Description

PURASAL HiPure P Plus is the potassium salt of natural L(+)-lactic acid, which is produced by fermentation from sugar. It has no taste impact on the end product, antimicrobial properties and is neutral by pH. PURASAL HiPure P Plus is a clear liquid solution. Potassium-L-lactate is soluble in water.

PURASAL HiPure P Plus is the ultra pure food grade potassium-L-lactate with excellent organoleptic properties.

#### Specification

Product Form	potassium-L-lactate liquid
--------------	----------------------------

#### Assay

Assay (w/w)	76.4-79.6%
Assay potassium (w/w)	23.3-24.3%
Density at 20°C	1.44-1.46g/ml
Refractive index at 25°C	1.439-1.447

#### Visual sensoric characteristics

Color fresh	max. 50 Apha
Flavor	passes test
Odor	passes test

#### Identification

Identification of potassium and lactate	passes test
Stereochemical purity (L-isomer)	min. 95%

#### Purity

Cyanide	max. 0.4 ppm
Lead	max. 2 mg/kg
Citrate/oxalate/phosphate/tartrate	passes test
Sugars	passes test
Methanol and methyl esters (w/w)	max. 0.025%
Chloride (w/w)	max. 0.04%
Sulphate (w/w)	max. 0.004%
pH (direct)	8.5-9.5
pH 10% (v/v)	5.5-7.0
Sodium (w/w)	max. 0.1%

#### Physical-chemical properties

Molecular formula	CH <sub>3</sub> CHOHCOOK
Molecular weight	128 (anhydrous)
Chemical name	Potassium-L-2-hydroxy-propionate

Copyright © PURAC. All rights reserved. No part of this publication may be copied, downloaded, reproduced, stored in a retrieval system or transmitted in any form by any means, electronic, mechanical, photocopying, recorded or otherwise, without permission of the publisher. No representation or warranty is made as to the truth or accuracy of any data, information or opinions contained herein or as to their suitability for any purpose, condition or application. None of the data, information or opinions contained herein may be relied upon for any purpose or reason. PURAC disclaims any liability, damages, losses or other consequences suffered or incurred in connection with the use of the data, information or opinions contained herein. In addition, nothing contained herein shall be construed as a recommendation to use any products in conflict with existing patents covering any material or its use.

For further information:

<http://www.purac.com/>

Page 1 of 2



## Registration

## Packaging

Copyright © PURAC. All rights reserved. No part of this publication may be copied, downloaded, reproduced, stored in a retrieval system or transmitted in any form by any means, electronic, mechanical, photocopied, recorded or otherwise, without permission of the publisher. No representation or warranty is made as to the truth or accuracy of any data, information or opinions contained herein or as to their suitability for any purpose, condition or application. None of the data, information or opinions contained herein may be relied upon for any purpose or reason. PURAC disclaims any liability, damages, losses or other consequences suffered or incurred in connection with the use of the data, information or opinions contained herein. In addition, nothing contained herein shall be construed as a recommendation to use any products in conflict with existing patents covering any material or its use.

## Product data

Rev.No.4/3109

CAS number	85895-78-9 (general 996-31-6)
EEC additive number	E 326
USA	GRAS
Complies with	FCC*

\* complies with FCC if pH (direct) is max. 9.0

PURASAL HiPure P Plus is supplied in 210 L (55 gallon) polyethylene drums (290 kg, 639 lbs), 1000 L (264 gallon) semi-bulk containers (1440 kg, 3175 lbs) and bulk containers.

---

For further information:

<http://www.purac.com/>

Page 2 of 2



## Nutritional data

Rev.No. 1/3109

### Nutritional information\* per 100 gram product

#### PURASAL<sup>®</sup> HiPure P Plus

Calories	(kCal)	195
	(kJ)	816
Calories from fat	(kCal)	0
Protein	(g)	0
Total carbohydrates	(g)	54.2
Complex carb.	(g)	0
Simple sugars	(g)	0
Other carb. <sup>1</sup>	(g)	54.2
Fat	(g)	0
Saturated fat	(g)	0
Unsaturated fat	(g)	0
Cholesterol	(mg)	0
Dietary fiber	(g)	0
Soluble fiber	(g)	0
Insoluble fiber	(g)	0
Sodium	(mg)	26
Potassium	(mg)	23800
Calcium	(mg)	0
Iron	(mg)	0
Vitamin A	(mg)	0
Thiamin (Vit. B1)	(mg)	0
Riboflavin (Vit. B2)	(mg)	0
Niacin (Vit. B3)	(mg)	0
Vitamin C	(mg)	0

*These values are measured or based on specifications but can vary slightly. They should be considered as typical values.*

*<sup>1</sup>100 gram lactic acid/lactate equals 360 kCal and 1 kCal is 4.18 kJ  
100 gram gluconic acid/gluconate equals 300 kCal*

Copyright © PURAC. All rights reserved. No part of this publication may be copied, downloaded, reproduced, stored in a retrieval system or transmitted in any form by any means, electronic, mechanical, photocopy, recorded or otherwise, without permission of the publisher. No representation or warranty is made as to the truth or accuracy of any data, information or opinions contained herein or as to their suitability for any purpose, condition or application. None of the data, information or opinions contained herein may be relied upon for any purpose or reason. PURAC disclaims any liability, damages, losses or other consequences suffered or incurred in connection with the use of the data, information or opinions contained herein. In addition, nothing contained herein shall be construed as a recommendation to use any products in conflict with existing patents covering any material or its use.

For further information:

<http://www.purac.com/>

Page 1 of 1

**Potassium-L-Lactate**

 Revision Date: 04/06/07  
 Ref. SD0150/2007-01

**1. IDENTIFICATION OF THE  
SUBSTANCE /  
PREPARATION  
AND THE  
COMPANY /  
UNDERTAKING**

<b>Product name</b>	PURASAL® P PURASAL® HiPure P PURASAL® HiPure P/F PURASAL® HiPure P/F3 PURASAL® HiPure P Plus	
<b>Use of the Substance</b>	Food additive, Specialty chemical	
<b># Supplier</b>	PURAC America, Inc. 111 Barclay Blvd. Lincolnshire, IL 60089 USA	PBR sínteses Rua Augusta, nr. 1939 - sala 122/123 São Paulo SP- Brazil
<b>Telephone</b>	(847) 634 6330	+55 11 3062 1535
<b>Fax</b>	(847) 634 1992	+55 11 3062 4011
<b>Emergency Telephone</b>	(800) 424 9300	+55 11 3062 1535
<b>Supplier</b>	PURAC biochem Arkelsedijk 46 NL-4206 AC Gorinchem The Netherlands	PURAC bioquímica Gran Vial 19-25 E 08160 Montmeló Barcelona Spain
<b>Telephone</b>	++31 183 695695	++34 93 568 6300
<b>Fax</b>	++31 183 695604	++34 93 568 3955
<b>Emergency Telephone</b>	++31 183 695695	++34 93 568 6300 (Ext. 222)

**2. COMPOSITION /  
INFORMATION ON  
INGREDIENTS**

<b>Chemical nature of the substance</b>	Potassium-S(-)-2-hydroxy propanoate aqueous solution		
<b>Synonyms</b>	Potassium L-2-hydroxy propanoate Lactic Acid Potassium salt		
<b>Components</b>	<b>EC-No.</b>	<b>CAS-No.</b>	<b>Weight, %</b>
Potassium-L-Lactate	289-752-8	85895-78-9 (General 996-31-6)	60-78
<b>Water</b>	balance		
<b>Hazard classification</b>	The product contains no substances which at their given concentration are considered to be hazardous to health.		

**3. HAZARDS IDENTIFICATION**
**Most important hazards** May cause eye irritation with susceptible persons.

Copyright © PURAC. All rights reserved. No part of this publication may be copied, downloaded, reproduced, stored in a retrieval system or transmitted in any form, by any means, electronic, mechanical, photocopy, recorded or otherwise, without permission of the publisher. No representation or warranty is made as to the truth or accuracy of any data, information or opinions contained herein or as to their suitability for any purpose, condition or application. None of the data, information or opinions contained herein may be relied upon for any purpose or reason. PURAC disclaims any liability, damages, losses or other consequences suffered or incurred in connection with the use of the data, information or opinions contained herein. In addition, nothing contained herein shall be construed as a recommendation to use any products in conflict with existing patents covering any material of its use.

For further information:

<http://www.purac.com/>

Page 1 of 5

Potassium-L-Lactate

Revision Date: 04/06/07  
Ref. SD0150/2007-01

#### 4. FIRST AID MEASURES

**General advice** Show this safety data sheet to the doctor in attendance.  
**Inhalation** Move to fresh air.  
**Skin contact** Wash off with water.  
**Eye contact** Rinse thoroughly with plenty of water, also under the eyelids.  
**Ingestion** Drink water.  
**Major effects of exposure** May cause eye irritation with susceptible persons

#### 5. FIRE-FIGHTING MEASURES

**Suitable extinguishing media** Water, carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), foam.  
**Extinguishing media which must not be used f or safety reasons** None.  
**Specific hazards** Burning produces irritant fumes.  
**Special protective equipment for firefighters** None.  
**Specific methods** Standard procedure for chemical fires.

#### 6. ACCIDENTAL RELEASE MEASURES

**Personal precautions** Avoid contact with eyes.  
**Environmental precautions** No special environmental precautions required.  
**Methods for cleaning up** Flush with water.

#### 7. HANDLING AND STORAGE

**Handling**

**Technical measures/ Precautions** No special technical protective measures required.  
**Safe handling advice** Handle in accordance with good industrial hygiene and safety practice.

**Storage**

**Technical measures/ Storage conditions** Keep tightly closed.  
**Packaging material** All steel and plastic packages.

Copyright © PURAC. All rights reserved. No part of this publication may be copied, disseminated, reproduced, stored in a retrieval system or transmitted in any form by any means electronic, mechanical, photocopied, recorded or otherwise, without permission of the publisher. No representation or warranty is made as to the truth or accuracy of any data, information or opinions contained herein or as to their suitability for any purpose, condition or application. None of the data, information or opinions contained herein may be relied upon for any purpose or reason. PURAC disclaims any liability, damages, losses or other consequences suffered or incurred in connection with the use of the data, information or opinions contained herein. In addition, nothing contained herein shall be construed as a recommendation to use any products in conflict with existing patents covering any material or its use.

For further information:

<http://www.purac.com/>

Page 2 of 5



## SAFETY DATA SHEET

Potassium-L-Lactate

Revision Date: 04/06/07  
Ref. SD0150/2007-01

### 8. EXPOSURE CONTROLS / PERSONAL PROTECTION

<b>Engineering measures to reduce exposure</b>	Insure adequate ventilation, especially in confined areas.
<b>Control parameters</b>	None.
<b>Personal protection equipment</b>	No special protective equipment required.
<b>Hygiene measures</b>	Handle in accordance with good industrial hygiene and safety practice.

### 9. PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

<b>Form</b>	aqueous solution
<b>Color</b>	light yellow
<b>Odor</b>	slight / none
<b>pH</b>	6.5 – 9.0
<b>Molecular Weight</b>	129
<b>Boiling point/range</b>	239°F (115°C) (60% solution) 277°F (136°C) (78% solution)
<b>Decomposition temperature</b>	>392°F(200°C)
<b>Autoignition temperature</b>	not applicable
<b>Flash point</b>	not applicable
<b>Explosion limits</b>	not applicable
<b>Density</b>	1320 - 1350kg/m <sup>3</sup> @ 20°C (60 % solution) 1440 - 1460kg/m <sup>3</sup> @ 20°C (78 % solution)
<b>Solubility</b>	Water solubility: completely soluble
<b>Viscosity</b>	24 - 26 mPa.s @ 68°F(20°C) (60% solution) 120 - 160 mPa.s @ 68°F(20°C) (78% solution)

### 10. STABILITY AND REACTIVITY

<b>Stability</b>	Stable at normal conditions.
<b>Conditions to avoid</b>	Temperatures above 392°F(200°C).
<b>Materials to avoid</b>	None.
<b>Hazardous decomposition products</b>	Carbon oxides.

Copyright © PURAC. All rights reserved. No part of this publication may be copied, downloaded, reproduced, stored in a retrieval system or transmitted in any form by any means, electronic, mechanical, photocopied, recorded or otherwise, without permission of the publisher. No representation or warranty is made as to the truth or accuracy of any data, information or opinions contained herein or as to their suitability for any purpose, condition or application. None of the data, information or opinions contained herein may be relied upon for any purpose or reason. PURAC disclaims any liability, damages, losses or other consequences suffered or incurred in connection with the use of the data, information or opinions contained herein. In addition, nothing contained herein shall be construed as a recommendation to use any products in conflict with existing patents covering any material or its use.

For further information:

<http://www.purac.com/>

Page 3 of 5





## SAFETY DATA SHEET

**Potassium-L-Lactate**

Revision Date: 04/06/07  
Ref. SD0150/2007-01

### 11. TOXICOLOGICAL INFORMATION

**Acute toxicity** Health injuries are not known or expected under normal use.  
**Local effects** May cause eye irritation with susceptible persons.  
**Specific effects** Based on tests with L-lactic acid and its salts, there is no evidence to suggest carcinogenic nor mutagenic properties from lactic acid itself nor from the lactate portion of its metal salts.

### 12. ECOLOGICAL INFORMATION

**Mobility** Completely soluble in water.  
**Persistence / degradability** Product is a salt of lactic acid which is readily biodegradable.  
**Bioaccumulation** Unlikely.  
**Ecotoxicity** Ecological injuries are not known or expected under normal use. (No effect on Daphnia @ 10g/l.)

### 13. DISPOSAL CONSIDERATIONS

**Waste from residues / unused products** Can be disposed as waste water, when in compliance with local regulations. Can be landfilled or incinerated, when in compliance with local regulations.  
**Contaminated packaging** Clean container with water.  
Empty containers should be taken for local recycling, recovery or waste disposal.

### 14. TRANSPORT INFORMATION

Not classified as dangerous in the meaning of transport regulations.

### 15. REGULATORY INFORMATION

**US Regulations** TSCA Inventory Status: Y  
SARA III: N  
California Proposition 65: N  
Carcinogenic status: OSHA: N. NTP: N, IARC: N  
FDA: GRAS

**EU Status** According to National equivalent of EC-Dir. 67/548, as amended, the product does not need to be labeled.

EU Food additive E326

Copyright © PURAC. All rights reserved. No part of this publication may be copied, downloaded, reproduced, stored in a retrieval system or transmitted in any form by any means electronic, mechanical, photocopied, recorded or otherwise, without permission of the publisher. No representation or warranty is made as to the truth or accuracy of any data, information or opinions contained herein or as to their suitability for any purpose, condition or application. None of the data, information or opinions contained herein may be relied upon for any purpose or reason. PURAC disclaims any liability, damages, losses or other consequences suffered or incurred in connection with the use of the data, information or opinions contained herein. In addition, nothing contained herein shall be construed as a recommendation to use any products in conflict with existing patents covering any material or its use.

For further information:

<http://www.purac.com/>

Page 4 of 5



## SAFETY DATA SHEET

Potassium-L-Lactate

Revision Date: 04/06/07  
Ref. SD0150/2007 -01

### 16. OTHER INFORMATION

**NFPA Ratings (Scale 0-4):** 0(health)-0(flammability)-0(reactivity)  
**HMIS Rating:** 0(health)-0(flammability)-0(reactivity)-A (protective equipment)

Further information on the safety assessment of Potassium Lactate and lactic acid can be obtained in a CFTA Report of June 6th 1997.

Additional data on the calculated ecotoxicity of lactic acid and its salts and esters can be obtained in a report entitled 'The ecotoxicity and biodegradability of lactic acid, alkyl lactate esters and lactic acid salts' by Bowmer et al.  
(Reference: Chemosphere 37: 1317-1333 (1998))

This information only concerns the above mentioned product and is not valid if used with other product(s) or in any process. The information is to our best present knowledge correct and complete and is given in good faith but without warranty. It remains the user's own responsibility to make sure that the information is appropriate and complete for his special use of this product.

# Indicates updated section.

Copyright © PURAC. All rights reserved. No part of this publication may be copied, downloaded, reproduced, stored in a retrieval system or transmitted in any form by any means electronic, mechanical, photocopied, recorded or otherwise, without permission of the publisher. No representation or warranty is made as to the truth or accuracy of any data, information or opinions contained herein or as to their suitability for any purpose, condition or application. None of the data, information or opinions contained herein may be relied upon for any purpose or reason. PURAC disclaims any liability, damages, losses or other consequences suffered or incurred in connection with the use of the data, information or opinions contained herein. In addition, nothing contained herein shall be construed as a recommendation to use any products in conflict with existing patents covering any material or its use.

For further information:

<http://www.purac.com/>

Page 5 of 5



**FORMATO:** Int.TecA-001  
**CLAVE:** 3-B/001

**FECHA DE ULTIMA REVISIÓN:** C/05-03-05  
**HOJA 1 DE 1**

## INBAC 10- NA<sup>®</sup>

### DESCRIPCIÓN GENERAL

*INBAC 10 NA<sup>®</sup>* fabricado por Chemital S. A es un conservante formulado a base de Nisina, Ácidos Orgánicos (Láctico, Sórbico, Cítrico) y propilparaben de gran efectividad frente a los microorganismos capaces de alterar los alimentos. Composición cualitativa: E-234, E-270, E-200, E-330, E-216, en sal como excipiente.

### ESPECIFICACIONES FISICOQUIMICAS

Aspecto	: Polvo blanco amarillento a gris claro
Solubilidad (sol. 1%)	: Dispersable en agua
pH (sol al 1%)	: 3.5 ± 0.5
Densidad aparente a 20 °C	: 0.9 ± 0.3 gr/ml
Humedad	: Inf. 10.0%
Contenido en NaCl	: 75.0 ± 1.0%

### APLICACIONES Y DOSIS DE UTILIZACIÓN

- En productos cárnicos inyectados, se aconsejan dosis de 1 a 3grs. de *INBAC 10-NA<sup>®</sup>* por Kg. de producto acabado. Recomendamos la adición del producto a la salmuera a fin de asegurar una distribución homogénea.
- En productos cárnicos emulsionados, recomendamos una dosis de 1 a 3grs. de *INBAC 10-NA<sup>®</sup>* por Kg. de producto acabado, adicionándolo directamente sin dilución durante el proceso de mezclado ó emulsión.
- Para productos lácteos se recomienda una dosis de 1 a 3 grs. de *INBAC 10-NA<sup>®</sup>* por Kg. de producto acabado.
- Para productos de confitería y pastelería, se recomienda una dosis del 0.03% de *INBAC 10-NA* adicionándose en la etapa de mezclado o batido.
- Una solución de un 0.5 ó 1.0% de *INBAC 10-NA<sup>®</sup>* se aconseja en el tratamiento superficial del producto acabado.

### PRESENTACION Y ALMACENAJE

*INBAC 10-NA<sup>®</sup>* se envasa en cajas de cartón de presentación de 25kg. No precisa precauciones especiales para su manipulación. Se recomienda almacenar el producto a una temperatura inferior a 30 °C. En estas condiciones su vida de anaquel es de 12 meses a partir de su fecha de fabricación.

Para mayor información sobre la utilización de este producto, favor de comunicarse al Departamento Técnico de:  
**Interlimen, S.A de C.V.**  
Av. 16 de Septiembre N°.38, Col. La Cruz, 08310 México, D.F. Tel. (55) 5654-5621 y 5654-5631 Fax (55) 5657-2912  
[www.interlimen.com](http://www.interlimen.com) [jvega@interlimen.com](mailto:jvega@interlimen.com)