

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

CBS

**CAMBIOS EN PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS
RELACIONADOS CON LA CALIDAD DE LA CARNE DE
CERDO SOMETIDA A FERMENTACIÓN LÁCTICA COMO
MÉTODO DE BIOCONSERVACIÓN.**

Directora de tesis: Dra. Isabel Guerrero Legarreta

Asesora: Dra. Edith Ponce Alquicira

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

Ing. Hugo Minor Pérez

Matrícula: 96358636

H. Jurado

Dra. Isabel Guerrero Legarreta (UAM-Izt)

Dra. Edith Ponce Alquicira (UAM-Izt)

Dra. Amelia Farrés González-Saravia (UNAM)

Dr. Carlos Regalado González (UAQ)

México, D.F., a 3 de Noviembre de 1999.

DEDICATORIA

- ❖ Especialmente a mis padres, simplemente gracias.....
- ❖ A mis hermanos, Mario, Esteban, Elena y Noé.
- ❖ A mis sobrinos, Verónica, Ulises y Giovanni.
- ❖ A la Dra. Isabel Guerrero Legarreta quien con su ejemplo de esfuerzo y perseverancia me ayudo a encontrar el camino del éxito.
- ❖ A las Doctoras Edith y Arely por asesorarme durante el trabajo experimental.
- ❖ Por que te considero un gran amigo, Roberto. Gracias por haber compartido conmigo momentos muy agradables, grandes retos y mostrarme que con gran fortaleza de espíritu es posible alcanzar las metas planteadas.
- ❖ A la Maestra en Biotecnología y dentro de poco tiempo Doctora Keiko Shirai Matsumoto, por haber tenido la oportunidad de conocerla y enseñarme que el trabajo duro nos puede sacar adelante. Gracias especialmente, por haberme animado durante la escritura de la tesis.
- ❖ A mis amigos de la Licenciatura: Norma, Maricela, Gabriel, Verónica, Paty, Rosalba, Mariana, Job, Angeles, Antonio y Lili quienes siempre estuvieron conmigo en los momentos importantes de mi vida personal y profesional.

❖ **A mis amigos de la Maestría en Biotecnología: Cristina, Pepe, Verónica, Mónica, Margarita, Gabriel y Teresa, por todos los momentos agradables que pasamos juntos.**

❖ **A Alfonso Totosaus Sánchez, por su ayuda incondicional e invaluable cada vez que lo solicitaba.**

❖ **A los compañeros del laboratorio: Ernesto, Silvia, Lúlu, Tatiana, Gamaliel, Maribel, porque con todos y cada uno he compartido momentos inolvidables.**

❖ **A mis profesores de la Licenciatura que me animaron a estudiar la Maestría en Biotecnología, la Dra. Socorro Retana, Ing. Rosa María Galicia, M. en C. Elisa Vega y M. en C. Sergio Hernández.**

❖ **Al buen amigo Luis.**

AGRADECIMIENTOS

❖ A la UAM-Iztapalapa, institución que me dió la oportunidad de formarme como profesionista con una Licenciatura en Ingeniería de los Alimentos, la Maestría en Biotecnología y ahora el Doctorado en Ciencias Biológicas.

❖ A Conacyt por el apoyo económico recibido durante la Maestría en Biotecnología.

❖ A la Dra. Isabel Guerrero Legarreta por haberme permitido trabajar en el Área de Bioquímica de Macromoléculas, apoyarme y motivarme siempre, en los momentos difíciles.

❖ A la Dra. Edith Ponce Alquicira por haber tenido paciencia para escucharme y asesorarme cada vez que lo solicitaba.

❖ Al Biólogo Samuel Macias Bravo de la Universidad Iberoamericana por su invaluable ayuda en el análisis de ácidos grasos.

	Pag.
INDICE GENERAL	
Dedicatoria	i
Agradecimientos	iii
Índice general	iv
Índice de tablas	viii
Índice de figuras	xi
Resumen	xiii
1. INTRODUCCIÓN	2
2. JUSTIFICACIÓN	6
3. OBJETIVOS	8
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
4.1 <i>Antecedentes</i>	10
4.2 <i>Composición de la carne</i>	16
4.2.1 Proteínas	17
4.2.2 Lípidos	18
4.2.3 Carbohidratos	20
4.3 <i>Propiedades fisicoquímicas</i>	21
4.3.1 pH	21
4.3.2 Capacidad de retención de agua	22
4.3.3 Color	22

	Pag.
4.3.4 Textura	24
4.4 <i>Cambios durante la descomposición de la carne</i>	25
4.4.1 Factores intrínsecos	27
4.4.2 Factores extrínsecos	28
4.5 <i>Alternativas de conservación de la carne</i>	30
4.5.1 Atmósferas modificadas	30
4.5.1.1 Microflora en carne envasada al vacío	32
4.5.2 Fermentación láctica	33
4.5.2.1 Bacterias lácticas	34
4.5.2.2 Propiedades antagónicas de las bacterias lácticas	36
4.5.2.3 Actividad proteolítica	40
4.5.2.4 Actividad lipolítica	41
4.6 <i>Técnicas analíticas empleadas</i>	41
4.6.1 Electroforesis	42
4.6.2 Cromatografía de gases	43
5. MATERIAL Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES	46
5.1 <i>Preparación de muestras</i>	46
5.2 <i>Evaluación fisicoquímica</i>	47
5.2.1 Medición de pH	47
5.2.2 Cuantificación de acidez total titulable	47
5.2.3 Capacidad de retención de agua	48
5.2.4 Color	48

	Pag.
5.2.5 Textura	49
5.3 <i>Evaluación microbiológica</i>	50
5.3.1 Crecimiento de bacterias lácticas	50
5.3.2 Crecimiento de <i>Enterobacteriaceae</i>	51
5.4 <i>Evaluación de proteólisis y lipólisis en carne</i>	52
5.4.1 Perfil electroforetico de proteínas miofibrilares	52
5.4.2 Perfil de ácidos grasos de cadena larga	53
5.5 <i>Cuantificación de ácido láctico y acético</i>	55
5.6 <i>Análisis estadístico</i>	56
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
6.1 <i>Evaluación fisicoquímica</i>	58
6.1.1 pH	58
6.1.2 Acidez total titulable	59
6.1.3 Capacidad de retención de agua	62
6.1.4 Color	65
6.1.5 Textura	67
6.2 <i>Evaluación microbiológica</i>	69
6.2.1 Crecimiento de bacterias lácticas	69
6.2.2 Crecimiento de <i>Enterobacteriaceae</i>	71
6.3 <i>Actividad proteolítica y lipolítica en carne</i>	74
6.3.1 Degradación de proteínas	74
6.3.2 Análisis de ácidos grasos de cadena larga	78

	Pag.
6.4 <i>Análisis de formación de ácidos láctico y acético</i>	81
7. CONCLUSIONES	87
8. BIBLIOGRAFÍA	90
Anexo I: Análisis estadístico	104
Anexo II: Curvas de ajuste de regresión	111
Anexo III: Determinación de la curva patrón de ácidos láctico y acético	115
Anexo IV: Determinación de la curva patrón de ácido grasos de cadena larga	118
Anexo V: Evaluación fisicoquímica	124
Anexo VI: Medios de cultivo empleados para la evaluación microbiológica	129

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Aplicación de ácidos orgánicos como agentes descontaminantes en carne.	12
Tabla 2 Reducción de microorganismos de descomposición en carne utilizando bacterias lácticas.	15
Tabla 3 Composición aproximada del músculo esquelético de mamíferos.	16
Tabla 4 Localización y funciones principales de las proteínas miofibrilares.	19
Tabla 5 Composición de los lípidos de la carne de cerdo.	21
Tabla 6 Condiciones de incubación para el análisis de bacterias lácticas.	50
Tabla 7 Condiciones de incubación para el análisis de <i>Enterobacteriaceae</i> .	51
Tabla 8 Concentración de los ácidos grasos de cadena larga en carne de cerdo almacenada a temperatura de 4°C.	80
Tabla 9 Concentración de los ácidos grasos de cadena larga en carne de cerdo almacenada a 19°C.	81
Tabla 10 Análisis estadístico del pH.	104
Tabla 11 Análisis estadístico de la acidez total titulable (ATT).	105
Tabla 12 Análisis estadístico de la diferencia de color (ΔE).	106
Tabla 13 Análisis estadístico de la textura. (por compresión) (N).	107
Tabla 14 Análisis estadístico de la población de las bacterias lácticas (ufc/g).	108

	Pag.
Tabla 15 Análisis estadístico de la población de <i>Enterobacteriaceae</i> (ufc/g).	109
Tabla 16 Análisis estadístico para la capacidad de retención de agua (ml de solución de NaCl 0.6 N retenida/5 g de carne).	110
Tabla 17 Ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) para pH.	111
Tabla 18 Ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) para ATT.	111
Tabla 19 Ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) para la CRA	112
Tabla 20 Ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) para el color.	112
Tabla 21 Ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) para la textura	113
Tabla 22 Ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) para las poblaciones de bacterias lácticas.	113
Tabla 23 Ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) para las poblaciones de <i>Enterobacteriaceae</i>	114
Tabla 24 Areas obtenidas de ácido láctico y acético a diferentes concentraciones.	115
Tabla 25 Concentración de ácido láctico y acético en carne de cerdo fermentada y control, a lmacenada a 4 y 19°C.	117
Tabla 26 Composición de los metil esterres de los ácidos grasos estándares.	118
Tabla 27 Concentración de ácidos grasos de cadena larga en carne de cerdo fermentada y control, almacenada a 4 y 19°C (mg/100 g de carne)	122

	Pag.
Tabla 28 pH de carne de cerdo fermentada y control, almacenada a 4 y 19°C.	124
Tabla 29 Acidez total titulable (ATT) de carne de cerdo fermentada y control, almacenada a 4 y 19°C.	125
Tabla 30 Color (sistema L, a y b) de carne de cerdo fermentada y control, almacenada a 4 y 19°C.	126
Tabla 31 Fuerza (N) necesaria para comprimir en 50% carne de cerdo fermentada y control, almacenada a 4 y 19°C.	127
Tabla 32 Capacidad de retención de agua 8ml de solución NaCl 0.6 N/5 g de carne) carne de cerdo fermentada y control, almacenda a 4y 19°C.	128
Tabla 33 Composición del caldo MRS (Merck).	129
Tabla 34 Composición del agar de bilis y rojo violeta (Bioxon).	129

INDICE DE FIGURAS

ig. 1 Pigmentos de la carne cruda.	24
Fig. 2 Representación esquemática de las principales rutas de fermentación de hexosas de las bacterias lácticas.	37
Fig. 3 Esquema del color en un espacio en tres dimensiones.	49
Fig. 4 Cambios en el pH de la carne de cerdo almacenada a 4°C.	60
Fig. 5 Cambios en el pH de la carne de cerdo almacenada a 19°C.	60
Fig. 6 Cambios en la acidez total titulable de la carne de cerdo almacenada a 4°C.	61
Fig. 7 Cambios en la acidez total titulable de la carne de cerdo almacenada a 19°C.	62
Fig. 8 Cambios en la capacidad de retención de agua (CRA) en carne de cerdo almacenada a 4°C.	63
Fig. 9 Cambios en la capacidad de retención de agua (CRA) en carne de cerdo almacenada a 19°C.	64
Fig. 10 Cambios en ΔE de la carne de cerdo almacenada a 4°C.	65
Fig. 11 Cambios en ΔE de la carne de cerdo almacenada a 19°C.	66
Fig. 12 Fuerza necesaria para una compresión al 50% en carne de cerdo almacenada a 4°C.	67
Fig. 13 Fuerza necesaria para una compresión al 50% en carne de cerdo almacenada a 19°C.	68

	Pag.
Fig. 14 Población de bacterias lácticas a 4°C.	71
Fig. 15 Población de bacterias lácticas a 19°C.	72
Fig. 16 Población de <i>Enterobacteriaceae</i> a 4°C.	73
Fig. 17 Población de <i>Enterobacteriaceae</i> a 19°C.	74
Fig. 18 Perfil electrofóretico de las proteínas contráctiles mayores miosina y actina en carne de cerdo almacenada a 4°C.	77
Fig. 19 Perfil electrofóretico de las proteínas contráctiles mayores miosina y actina en carne de cerdo almacenada a 19°C.	78
Fig. 20 Perfil de formación de ácido láctico a 4°C.	83
Fig. 21 Perfil de formación de ácido láctico a 19°C.	84
Fig. 22 Perfil de formación de ácido acético a 4°C.	85
Fig. 23 Perfil de formación de ácido acético a 19°C.	86
Fig. 24 Curva patrón para ácido láctico.	116
Fig. 25 Curva patrón para ácido acético.	116
Fig. 26 Curva patrón para el ácido palmítico.	119
Fig. 27 Curva patrón para el ácido oléico.	119
Fig. 28 Curva patrón para el ácido mirístico.	120
Fig. 29 Curva patrón para ácido linolénico.	120

	Pag.
Fig. 30 Curva patrón para ácido linoleico.	121
Fig. 31 Curva patrón para el ácido esteárico.	121

RESUMEN

En la presente tesis se realizó una investigación experimental sobre la aplicación de la fermentación láctica controlada sobre la superficie de carne de cerdo como método de bioconservación para aumentar la vida media de este alimento. Se estudiaron los cambios en parámetros de la calidad de la carne como color, textura, capacidad de retención de agua (CRA), además de medir y cuantificar el cambio en el pH, la acidez total titulable, la producción de ácidos láctico y acético, así como el efecto en las proteínas contráctiles mayores actina y miosina y la formación de ácidos grasos libres de cadena larga. Además se llevo a cabo un seguimiento de crecimiento de enterobacterias como microorganismos indicadores de descomposición y la cuantificación de las poblaciones de bacterias lácticas.

Se evaluaron dos cepas de bacterias lácticas, *Staphylococcus carnosus* y *Lactobacillus alimentarius* previamente estudiadas en el Área de Bioquímica de Macromoléculas por su capacidad de reducir el pH rápidamente sobre la superficie de la carne de cerdo, probando dos temperaturas de almacenamiento: 4°C que es la utilizada en refrigeración y la de 19°C porque a valores superiores el crecimiento de bacterias de descomposición se acelera rápidamente.

La carne de cerdo fue empacada al vacío para favorecer el crecimiento de las bacterias lácticas y disminuir la proliferación de bacterias del género *Pseudomonas sp.*, microorganismos que bajo condiciones aerobias y temperaturas de refrigeración están entre los principales responsables de la descomposición de la carne.

Asimismo la fermentación láctica controlada se aplicó sobre la superficie de la carne mediante la inoculación por inmersión de cepas puras liofilizadas de *Staphylococcus carnosus* y *Lactobacillus alimentarius* previamente activadas en caldo MRS.

Aun cuando se encontró en algunos tratamientos un efecto negativo sobre propiedades funcionales como color, textura y CRA, se mejoró la calidad sanitaria de la carne al

disminuir significativamente las poblaciones de enterobacterias, como consecuencia de la reducción de pH de la superficie de la carne por la producción de ácido láctico y la competencia por el sustrato entre las bacterias lácticas y la flora de descomposición.

Queda latente la posibilidad de realizar estudios sobre la reducción en las concentraciones de conservadores químicos en carne para elaborar productos cárnicos procesados, mediante la aplicación de la bioconservación.

Todo hombre debe decidir
una vez en la vida,
si se lanza a triunfar
arriesgándolo todo,
o se sienta en su balcón
tranquilamente a
contemplar el desfile
de los triunfadores.

Anónimo

1. INTRODUCCIÓN

La carne es un alimento básico en la dieta humana. Su importancia radica en que presenta un alto valor nutritivo por su contenido de proteínas que aportan aminoácidos esenciales como lisina, treonina e histidina, presentes en bajas concentraciones en la gran mayoría de proteínas vegetales (Carballo y López, 1991). Sin embargo tiene la desventaja de ser un alimento altamente perecedero debido a que su composición favorece el crecimiento de una gran cantidad de microorganismos. Estrictamente hablando la carne de animales sanos recién sacrificados es estéril, pero durante su matanza se genera una gran cantidad de contaminación microbiana debido al contacto con el suelo, paredes, utensilios utilizados, así como posible estallamiento de vísceras etc, (Guerrero, 1993).

La contaminación microbiana aunada a las condiciones inadecuadas de almacenamiento y transporte producen una aceleración en el proceso de descomposición de la carne por la flora bacteriana presente principalmente en la superficie. Esta problemática ha sido abordada de diversas formas siendo una de las más utilizadas la refrigeración que inhibe a la mayoría de microorganismos mesófilos, como *Brucella* y *Salmonella* (García y col., 1995), aunque se produce el predominio de *Pseudomonas*, *Achromobacter* y *Moraxella* además de especies anaerobias facultativas como enterobacterias psicrótrofas, *Aeromonas sp.*, *Alteromonas putrefaciens* y microorganismos Gram-positivos como *Lactobacillus sp.*, y *Brochothrix thermosphacta* (García y col., 1995).

De carne fresca también se han aislado bacterias mesófilas productoras de toxiinfecciones alimentarias como *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Campilobacter sp.*, *Escherichia coli* enterohemorrágico y *Listeria monocytogenes* aunque la mayoría de estos microorganismos no se desarrollan a temperaturas de refrigeración (Carballo y López, 1991; Guerrero, 1993).

Otros microorganismos responsables de la descomposición de la carne son las levaduras y los mohos, entre los cuales se encuentran principalmente los géneros *Penicillium*,

Cladosporium, *Thamnidium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Alternaria* y *Sporotichum* y entre las levaduras los géneros *Torulopsis*, *Candida* y *Rhodoturolo* (Carballo y López, 1991; Guerrero, 1993).

Ante la necesidad de reducir los efectos de la flora microbiana antes mencionada sobre la vida media de la carne han surgido un gran número de tecnologías enfocadas a resolver esta problemática; estos métodos de conservación tienden a retardar la descomposición. Uno de los más importantes que se utiliza en la industria es la refrigeración que conserva en buenas condiciones la carne durante aproximadamente dos semanas (Haynes, 1993), sin embargo sobre todo en las regiones cálidas de México, se presentan graves problemas con las largas distancias de transporte y con la falta o deficiencia en los equipos de refrigeración por lo que la carne es expuesta frecuentemente a temperaturas elevadas. Además de la aplicación de bajas temperaturas existen otros métodos tradicionales como el secado, el salado, el ahumado y actualmente se utiliza el envasado en atmósferas modificadas, el envasado al vacío, el tratamiento con ácidos orgánicos, con bacterias lácticas, con conservadores químicos y con irradiación, entre otros.

De los distintos métodos de conservación, la utilización de ácidos orgánicos presenta grandes ventajas porque aumentan la vida media de la carne sin alterar considerablemente las propiedades físicas, químicas y sensoriales (Ogden y col., 1995). De ellos destaca el ácido láctico que ha sido utilizado, entre otras alternativas, como agente bactericida en alimentos fermentados. El ácido láctico además tiene la ventaja de ser reconocido como GRAS, es decir como un conservador de grado alimentario para el consumo humano.

Por otra parte las actuales tendencias en el consumo de los alimentos provocan el desplazamiento de conservadores químicos aplicados en productos cárnicos, como nitratos, nitritos, fenoles y antibióticos (Badui, 1991) hacia el uso de conservadores producidos naturalmente por la actividad metabólica de la microflora natural de la carne (Stiles, 1996).

En este contexto el ácido láctico puede ser obtenido por fermentación láctica *in situ* sobre la superficie cárnica con cepas seleccionadas de bacterias lácticas. Esta fermentación

controlada inhibe el crecimiento de microorganismos por la reducción en el pH de la carne a través de la producción del ácido. Otros compuestos formados son: peróxido de hidrógeno, diacetilo, acetaldehído y reuterina pero debido a sus bajas concentraciones presentan un menor efecto bactericida (García y col., 1995). También como resultado del establecimiento de una población de bacterias lácticas se provoca una actividad antagónica debida a la competencia por el sustrato disponible entre las bacterias lácticas y la flora de descomposición de la carne.

Aún cuando se tienen varios reportes de investigaciones sobre la aplicación de la fermentación láctica en la superficie de la carne (Guerrero y col., 1995; Stiles 1996; Dubois, 1979; Nielsen y col., 1990) es poca la atención que se le ha dado al estudio del efecto de esta fermentación sobre parámetros sensoriales de la carne (McMullen y Stiles, 1996). Considerar los cambios en propiedades como el sabor, color y textura es necesario para mantener la calidad de la carne, factor determinante en la aceptación del alimento por los consumidores, que asocian la falta de frescura con un color oscuro, al igual que con la presencia de sabores y olores indeseables.

La propuesta de esta tesis fue estudiar la aplicación de la fermentación láctica controlada sobre la superficie de la carne, como método de bioconservación para aumentar su vida útil, haciendo énfasis en los cambios originados sobre parámetros fisicoquímicos relacionados con las características sensoriales y la inhibición de microorganismos que provocan descomposición.

**Los grandes espíritus se forman en sus
momentos de soledad, y con los
obstáculos que vencen al luchar
por nobles metas.**

Humberto Alpizar Olvera

2. JUSTIFICACIÓN

La carne de cerdo debido a su composición química y características biológicas, es un excelente medio para el crecimiento de microorganismos que provocan su descomposición, este proceso se acelera drásticamente cuando es expuesta a temperaturas superiores a los 15°C y a humedades altas (Guerrero y Taylor, 1994) situación que se presenta frecuentemente en países de climas semi-tropicales como México.

A este respecto la fermentación láctica, aplicada en la superficie de la carne, usando cepas seleccionadas de bacterias es útil como un método de conservación barato y eficiente, que permite alargar su vida media por la inhibición de la flora microbiana patógena y de descomposición, sin afectar considerablemente las propiedades químicas, físicas y sensoriales (Smulders y col., 1986).

En investigaciones previas realizadas en el Área de Bioquímica de Macromoléculas de la UAM Iztapalapa se observó que la carne de cerdo sometida a fermentación láctica, envasada al vacío y almacenada a un intervalo de temperatura superior al de refrigeración y hasta alrededor de 20°C se conserva en buenas condiciones, resultados que posiblemente permitirían reducir los costos originados por la instalación y consumo de energía eléctrica en carne conservada en refrigeración.

Finalmente la fermentación láctica controlada como método de conservación satisface las exigencias actuales de consumo, enfocadas principalmente hacia el uso de conservadores naturales en los alimentos capaces de reducir la flora patógena y de descomposición, además de no producir compuestos tóxicos y no presentar efectos indeseables sobre las características de los alimentos.

De esta forma se genera una amplia perspectiva de uso de bacterias lácticas como bioconservadores en carne fresca y otros alimentos, alternativa que hasta la fecha no ha sido explotada totalmente por la industria de la carne en México.

**Es tu principio
nadie podrá detenerte.
El camino es difícil,
pero más difícil será
no caminarlo cuanto antes.**

Anónimo

3 OBJETIVOS

Objetivo general

* Evaluar el efecto de la aplicación de la fermentación láctica controlada sobre parámetros fisicoquímicos, sensoriales y microbiológicos en carne de cerdo envasada al vacío para determinar las mejores condiciones de conservación.

Objetivos específicos:

* Evaluar el efecto de la fermentación láctica en carne de cerdo en los siguientes parámetros:

- Reducción de pH
- Incremento de la acidez total titulable (ATT)
- Capacidad de retención de agua
- Cambios en la textura
- Cambios en el color

* Evaluar el efecto de la fermentación láctica sobre la inhibición de enterobacterias como microorganismos indicadores de descomposición en carne, así como en la población de bacterias lácticas.

* Determinar el efecto de las bacterias lácticas sobre la degradación de proteínas contráctiles mayores (miosina y actina).

* Determinar el efecto de la fermentación láctica sobre la formación de ácidos grasos libres de cadena larga.

* Estudiar el patrón de fermentación en la carne de cerdo mediante la cuantificación de ácido láctico y acético.

**El éxito es tan poco común,
tan singular y ofrece tantos retos
que es necesario alcanzarlo.**

Anónimo

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 Antecedentes

Los procesos de conservación de los alimentos cambian constantemente y los métodos tradicionales como el secado, el ahumado y el salado entre otros, fueron desplazados por métodos más seguros y eficientes. De esta forma la refrigeración, el enlatado y los aditivos químicos pasaron a predominar a partir de los años 20 (Stiles, 1996), sin embargo recientemente ha surgido un auge hacia el consumo de alimentos mínimamente procesados y conservados en la forma más natural posible.

La conservación y elaboración de productos cárnicos no se ha visto libre de esta influencia, generando tecnologías enfocadas a incrementar su vida media con la aplicación de la bioconservación. Este término se refiere al hecho de extender la vida útil y mejorar la seguridad de los alimentos, usando la microflora natural de éstos o sus productos metabólicos (Stiles, 1996). En este sentido la obtención de ácidos orgánicos a través de fuentes microbianas es una alternativa nueva y con amplias perspectivas de desarrollo en la conservación de carne fresca.

La evolución en el empleo de ácidos orgánicos como agentes descontaminantes de carne puede dividirse en dos periodos. Inicialmente se investigó la viabilidad de aplicación de diversos ácidos orgánicos como inhibidores de microorganismos patógenos y de descomposición, además de evaluar su efecto sobre propiedades como el color, textura y, sobre todo, el sabor. Un panorama global de estas investigaciones se presenta en la Tabla 1.

Actualmente se explora la inoculación de bacterias lácticas seleccionadas sobre la superficie cárnica, para inhibir el crecimiento de microorganismos que provocan su descomposición. El número de investigaciones a este respecto aumenta rápidamente, enfocándose los estudios principalmente a la selección de cepas de bacterias lácticas capaces de prevalecer en carne

sobre la microflora de descomposición y tener repercusiones mínimas en propiedades sensoriales y fisicoquímicas.

Ziauddin y col. (1993) reportaron en un estudio *in vitro* que el ácido láctico inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona fragi*, *Salmonella newport* y *Bacillus cereus*, bacterias patógenas y de descomposición de carne. Mencionan además que este efecto se incrementa conforme disminuye el pH.

De la misma forma se ha reportado el empleo directo de ácidos orgánicos sobre carne. Woolthius y col. (1984) realizaron una investigación en hígado de cerdo empacado al vacío, comparando los tratamientos de ácido láctico y agua caliente. El ácido láctico al 2 % v/p aplicado directamente en la carne, redujo las cuentas de bacterias del género *Enterobacteriaceae*, pero provocó un cambio significativo en el color. Posteriormente Woolthius y Smulders (1985) aplicaron ácido láctico en carne de ternera y evaluaron el sabor y el grado de inhibición microbiana, los resultados mostraron que a concentraciones superiores a este porcentaje se producen sabores residuales debido al exceso de acidez, reduciéndose significativamente la cuenta de *Enterobacteriaceae* a concentraciones de 1.25% v/p de ácido láctico. Por otra parte el color presenta un cambio significativo a esta concentración de ácido láctico.

Smulders y col. (1986) mencionan en su estudio en carne de cerdo la reducción en la cuenta de *Enterobacteriaceae* y *Campylobacter sp.*, y extensión de la vida media bajo condiciones de refrigeración. El color no cambia a concentraciones de 1% v/p de ácido láctico y sólo se presentan sabores residuales a concentraciones superiores al 2% v/p.

También se han hecho estudios sobre el uso conjunto de ácidos orgánicos. Adams y Hall (1988) señalan que la mezcla de ácidos láctico y acético inhibe el crecimiento de *Escherichia coli*. Mendonca y col. (1989) demostraron que la combinación de ácido acético y ascorbato de sodio redujo la cuenta de *Enterobacteriaceae* y se presenta un cambio significativo en el

color. También observaron que debido a la reducción en el pH de la carne de cerdo, se produce un exudado excesivo de la carne, que va en detrimento de su calidad.

Tabla 1. Aplicación de ácidos orgánicos como agentes descontaminantes de carne.

Acido orgánico	Especie de animal	Referencia
Láctico, acético, fórmico, fosfórico	Pollo	Mountney O'Malley,1965
Acético	Cerdo	Bjemuller y col., 1973
Acético, propiónico	Cerdo	Reynolds y Carpenter,1974
Acético, láctico	Res	Anderson y col., 1977
Láctico, acético, propiónico	Res	Modie y col., 1978
Láctico	Res	Dezeure-Wallys y Vant'Hooft, 1980
Sórbico	Pollo	Robach, M. 1981
Cítrico, ascorbico, acético, láctico	Carnero, cabra y res	Leistner,1983
Láctico	Res	Smuiders y Woolthius,1985
Láctico	Ternero	Woolthius y Smuiders,1985
Láctico	Varias especies	Smulders y col., 1986
Láctico	Varias especies	Smulders, 1987
Acético, láctico	Res	Hamby y col., 1987
Acético, láctico, cítrico	Res	Accuf y col., 1987
Acético, láctico	Bufalo	Surve y col., 1991
Láctico, propiónico	Cerdo	Ogden y col., 1995

Ogden y col. (1995) probaron una combinación de ácidos láctico y propiónico, evaluaron textura, color y crecimiento microbiano. Estos autores reportaron que la combinación de los ácidos orgánicos tuvo efecto significativo sobre la reducción en la cuenta de *Pseudomonas*

como microorganismos indicadores de descomposición en carne. El color presenta un cambio significativo a concentraciones de 0.20 ml/l de ácido láctico y 0.39 ml/l de ácido propiónico, por otra parte la textura no presenta cambio significativo alguno.

El elevado costo de los ácidos orgánicos implica una desventaja para su aplicación en carne, buscándose por este motivo alternativas para su obtención. Se ha reportado la fermentación láctica *in situ* sobre la superficie de la carne como un medio barato y eficiente para la producción de ácido láctico (Guerrero y Taylor, 1994). Varias investigaciones a este respecto mencionan la inhibición de microorganismos patógenos y de descomposición, con el consiguiente aumento de la vida media de la carne.

En carne se han utilizado las bacterias lácticas como bioconservadores debido a que forman parte de la flora natural, llegando a predominar en carnes envasadas al vacío sobre la microflora total (Hitchener y col., 1982; Holzapfel y Gerber, 1983; Shaw y Harding, 1984). Una desventaja del envasado al vacío se debe al crecimiento poco selectivo de las bacterias lácticas, por lo que pueden prevalecer bacterias heterofermentativas, no recomendables como cultivos iniciadores para la conservación de carne (Buckenhuskens, 1993) o bacterias productoras de H₂S, compuesto que aún en bajas concentraciones produce intensos olores azufrados (Anh y Stiles., 1990). La poca disponibilidad de carbohidratos y la capacidad amortiguadora de la carne particularmente la de res provocan además que la fermentación láctica tenga poco efecto en el incremento de su vida útil (Stiles, 1996).

Una alternativa de control sobre la fermentación láctica en carne es la inoculación superficial de bacterias lácticas seleccionadas, usando cepas que tengan una elevada tasa de crecimiento y producción de ácido láctico al ser inoculadas en carne. La poca disponibilidad de carbohidratos en carne puede suplirse con la adición de una fuente de carbono, como la glucosa, fácilmente asimilable por las bacterias lácticas.

Una de las primeras investigaciones con bacterias lácticas se llevó a cabo en carne de res, estudiando la viabilidad de aplicación de los diferentes géneros. Dubois y col. (1979)

exploraron el uso de bacterias de los géneros de *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus* para inhibir microorganismos de descomposición como *Serratia sp.*, *Enterobacter sp.*, *Pseudomona putida*, *Pseudomona matophilia*, *Pseudomona cepacia* y *Pseudomona fluorescens*, aisladas a partir de carne. Estos autores concluyen que las bacterias del género *Streptococcus* y *Lactobacillus* presentan un mayor poder inhibitorio, siendo la cepa de *Streptococcus lactis* la más eficiente en la reducción del crecimiento de las bacterias probadas. En la misma línea de investigación Reddy y Chen (1975), evaluando la mezcla de cepas de *Streptococcus lactis* y *Leuconostoc citrovorum* en carne de res, obtuvieron inhibición del crecimiento de bacterias Gram-negativas y reportaron a su vez una reducción significativa en el pH de la carne.

En carnes envasadas al vacío también se han realizado investigaciones con bacterias lácticas como descontaminantes de carne. A este respecto Montel y Talon (1993) reportaron inhibición en el crecimiento de *Pseudomonas* y *Brochotrix thermosphacta* cuando se inocularon bacterias lácticas a concentraciones de 10^7 hasta 10^8 ufc/cm². Las bacterias lácticas además provocaron una reducción en el pH de la carne a valores de 4.0-4.5.

Lingren y Dobrogosz (1990) señalan que el uso de cepas de *Lactobacillus* y *Pediococcus* en salchichas incrementa su vida útil por inhibición de microorganismos de descomposición. Este resultado lo atribuyeron a la producción de compuestos bactericidas como el ácido láctico, asimismo reportaron inhibición debido a la competencia por el sustrato. También en salchichas Gibbs (1987) reportó inhibición de *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* en salchicha inoculada con cepas de bacterias lácticas.

Guerrero y col. (1995) estudiaron la viabilidad de aplicación de la fermentación láctica controlada como medio de descontaminación microbiana de la superficie cárnica a temperaturas superiores a las de refrigeración. Concluyen que la fermentación con cepas de *Lactobacillus bulgaricus* y *Pediococcus pentosaceus* reduce la tasa de crecimiento de *Pseudomonas* en carne de cerdo y res, envasada al vacío y almacenada a temperatura de alrededor de 25°C. Un aspecto en este estudio es el uso de sacarosa al 10% como fuente de

carbón para favorecer el desarrollo de las bacterias lácticas inoculadas, aunque los autores mencionan que con una concentración de sacarosa al 3% es suficiente para promover el crecimiento de las bacterias lácticas.

Un resumen de los estudios aplicando bacterias lácticas como medio de conservación se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Reducción de microorganismos de descomposición en carne utilizando bacterias lácticas.

Bacteria láctica	Microorganismo de descomposición	Carne o producto cárnico	Referencia
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Cerdo, res, borrego pavo	Gibbs, 1987
<i>Pedococcus acidolactici</i>	<i>Salmonella</i>		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>			
<i>Lactobacillus jensenii</i>	<i>Escherichia coli</i>	Salchichas	Roca y Kalman, 1989
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>			
<i>Pedococcus pentosaceus</i>	<i>Brochetrix thermosphacta</i>		
<i>Lactobacillus sake</i>	<i>Pseudomona spp.</i>	Salchichas	Montel y Talon, 1993
<i>Pedococcus pentosaceus</i>			
<i>Staphylococcus carnosus</i>			
<i>Staphylococcus warneri</i>			
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>			
<i>Lactobacillus curvatus</i>		Salchichas	Vogel y col., 1993
<i>Lactobacillus sake</i>			
<i>Streptococcus spp.</i>			
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Pseudomona spp.</i>	Cerdo, res	Guerrero y col., 1995

4.2 COMPOSICIÓN DE LA CARNE

La carne se define como todo aquel tejido animal que puede consumirse como alimento (Forrest, 1979). Sin embargo cuando se hace mención a carne, generalmente se hace referencia al tejido muscular de animales que han sido sacrificados y en los que ha tenido lugar el *rigor mortis*.

La carne es uno de los alimentos donde la composición de proteínas, lípidos y carbohidratos varía considerablemente dependiendo de la especie animal, la edad, el sexo, el tipo de alimentación y en condiciones ambientales, así como la región anatómica. La composición promedio en porcentaje de peso fresco del músculo esquelético se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición aproximada del músculo esquelético de mamíferos.

Componente	Porcentaje en peso fresco
Agua	65-80
Proteínas	16-22
Lípidos	1.3-1.5
Carbohidratos	0.5-1.0
Sustancias nitrogenadas no proteicas	1.0
Componentes inorgánicos	1.0

Forrest (1979)

4.2.1 Proteínas

Las proteínas son el componente más abundante de la materia seca en carne, cerca del 50% (Flores y Bernell, 1984). Estas proteínas se clasifican de diversas formas en función de su distribución en el músculo, forma, origen y solubilidad. Esta última característica permite dividir las proteínas en tres grupos: a) proteínas contráctiles o miofibrilares solubles en soluciones salinas concentradas, b) proteínas sarcoplásmicas, solubles en agua y en soluciones salinas diluidas y c) proteínas del tejido conectivo o del estroma que son insolubles. De estos grupos el más importante lo conforman las proteínas miofibrilares que representan alrededor del 50% del total de las proteínas del músculo y participan directamente en las funciones fisiológicas *in vivo* y los cambios estructurales posteriores al sacrificio de los animales, como la contracción muscular y la conversión post-mortem de músculo en carne, respectivamente.

La Tabla 4 muestra las diferentes proteínas miofibrilares y sus funciones principales, es importante destacar que la miosina y la actina constituyen cerca del 70% de las proteínas miofibrilares y son las responsables directas del proceso de contracción-relajación del músculo.

Por otra parte las proteínas sarcoplásmicas constituyen cerca del 7% del total de las proteínas del músculo esquelético. La mioglobina, la hemoglobina, las enzimas sarcoplásmicas y mitocondriales, además de los citocromos y las flavoproteínas forman parte de este grupo. Finalmente las proteínas del estroma forman alrededor del 3% de las proteínas totales del músculo esquelético, pertenecen a esta clasificación proteínas como el colágeno, la reticulina, la elástina y otras proteínas insolubles (Flores y Bernell, 1984).

Las modificaciones estructurales de las proteínas miofibrilares de carne fresca se deben a la presencia de enzimas proteolíticas ya sea de fuentes endógenas o exógenas. En el primer grupo se encuentran enzimas como las catepsinas y las calpaínas (Lawrie, 1985)

responsables del ablandamiento de la carne post-rigor por proteólisis a nivel de las miofibrillas y la estructura del tejido conectivo (Toldrá y Etherington, 1988). El segundo lo constituyen las enzimas proteolíticas producidas por la flora bacteriana de la superficie de la carne.

Con respecto a la conservación de carne fresca por fermentación láctica, se busca evitar que los cultivos iniciadores presenten actividad proteolítica notable sobre la carne, que vaya en detrimento de su calidad.

4.2.2 Lípidos

Un componente importante en la carne es la fracción lipídica debido a que su oxidación es una de las causas principales de deterioro de los alimentos, ocasionando cambios en el color, el sabor, la textura, el valor nutricional, la jugosidad, las características emulsificantes y el contenido calórico (Alle y Allen, 1981).

El contenido de lípidos en carne es muy variable. Las grasas animales se clasifican comúnmente como de depósito (del tejido adiposo) y grasas intramusculares (del tejido muscular). Las grasas de depósito están localizadas en capas subcutáneas, pero cantidades importantes pueden estar presentes entre los músculos como depósitos intermusculares y en otras zonas del cuerpo como alrededor del riñón, cavidad pélvica y alrededor del corazón.

Los triglicéridos son los principales componentes de todas las grasas de depósito y pueden ser extraídos con solventes como el cloroformo, el tetracloruro de carbono, el éter y otros solventes no polares (Kuang, 1992). Comparadas con las grasas de depósito, las del tejido muscular contienen grandes cantidades de fosfolípidos, los cuales están asociados a proteínas, en forma de lipoproteínas y proteolípidos. Para extraer a los fosfolípidos y los proteolípidos frecuentemente se usa una mezcla de cloroformo-metanol, con la cual más del 99% de los lípidos totales pueden ser extraídos del tejido animal. Esta mezcla es la que

Tabla 4. Localización y funciones principales de las proteínas miofibrilares.

Proteína	% proteínas miofibrilares	Localización en el sarcómero	Función principal
Proteínas mayores			
Contractiles			
Miosina	50	Banda A de los filamentos delgados	Contracción
Actina	20	Filamentos delgados	Contracción
Proteínas reguladoras			
Tropomiosina	3	Filamentos delgados	Regulación de la contracción
Troponina (complejo)	4.5	Disco Z	Regulación de la contracción
α -Actinina	1		Unión de los filamentos delgados
β -Actinina	< 0.01	Final de la banda A y filamento delgado	Inhibición de Actina G
λ -Actinina	< 0.01	Disco Z	Polymerizaciones, interacción con actina y α -Actinina
θ -Actinina	0.5		
Proteínas del citoesqueleto			
Titina (conectina)	5-8	Sección transversal del sarcómero	Sosten de los filamentos delgados
Nebulina	3	Banda I	Unión y sosten de titina
Proteína C	1.5	Filamento delgado	Unión de miosina en el filamento delgado
Miomesina (proteína M)	0.5	Línea M en el centro de la banda A	Unión de la miosina en el filamento delgado
Desmina (esqueletina)	< 0.2	Disco Z	Enganches transversales de las miofibrillas en el disco Z
Filamina	0.1	Disco Z	Enganches transversales en las miofibrillas en el disco Z
Vimentina	0.1	Disco Z	Enganches del disco-Z en la periferia
Sinemina	0.1	Disco Z	Asociación con desmina y vimentina
Proteína X (55.000 Da)	0.2	Disco Z	Enganches de los filamentos del disco-Z
Proteína I	0.1	Filamento delgado	Inhibidores de la actividad del ATPasa-Mg ²⁺
Proteína F	0.1	Filamento delgado	Unión de los filamentos delgados
Creatin cinasa	0.1	Línea M	Unión de la proteína-M

Pearson y Young (1989).

frecuentemente se utiliza para la extracción de lípidos en sistemas biológicos.

Los ácidos grasos de los triglicéridos y de otros lípidos en carne difieren en tamaño de la cadena de carbonos y en el tipo de uniones entre los átomos del carbono. Muchos de los ácidos grasos en animales contienen un número constante de los átomos de carbono, pero las ramificaciones y el número impar de carbonos de los ácidos grasos es bajo en la grasa de borrego y de res (Kuang, 1992).

El mayor porcentaje de ácidos grasos en la carne roja está compuesto principalmente de los ácidos saturados (SFA) mirístico (14:0), palmítico (16:0), esteárico (18:0), así como ácidos grasos moninsaturados (MUFA) palmitoleico (16:1) y oleico (18:1), y ácidos grasos polinsaturados (PUFA) como linoleico (18:2) y linolénico (18:3) (Kuang, 1992).

La concentración y proporción (como porcentaje total de ácidos grasos) de éstos ácidos grasos pueden verse influenciada por algunas variables como la especie del animal, región anatómica, dieta, sexo, edad, medio ambiente y método de cocimiento de la carne.

Así, en un mismo corte de carne el contenido de lípidos polares (predominantemente fosfolípidos) es más alto que el de los lípidos neutros (principalmente triglicéridos) del total de los lípidos. La composición de los lípidos de la carne de cerdo se muestra en la Tabla 5.

4.2.3 Carbohidratos

Los carbohidratos constituyen menos del 1% del peso de la carne, la mayoría de los cuales lo compone el glucógeno. En la mayoría de los animales el glucógeno se almacena en el hígado, por lo cual los cortes de carne son realmente una fuente muy pobre de carbohidratos (Forrest, 1979).

Tabla 5. Composición de lípidos de la carne de cerdo.

Componente	Subcutanea		
	Externa	Interna	Perirrenal
Ácidos grasos			
Laúrico	Trazas	Trazas	Trazas
Mirístico	1.3	0.1	4.0
Palmitico	28.3	30.1	28.0
Estearico	11.9	16.2	17.0
Araquídico	Trazas	Trazas	Trazas
Saturados totales	41.5	47.3	49.0
Palmitoleico	2.7	2.7	2.0
Oleico	47.5	40.9	36.0
Linolénico	6.0	7.1	11.8
Araquidónico	2.1	1.7	1.0
Insaturados totales	58.5	52.7	51.0

Forrest (1979).

4.3 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LA CARNE

4.3.1 pH

El pH de la carne es una característica fisicoquímica importante en la conservación de éste alimento, debido a que en carnes frescas sometidas a fermentación láctica la reducción del pH provoca inhibición de la flora contaminante.

Este parámetro está determinado en carne por la concentración de ácido láctico producido a partir del glucógeno durante la glucólisis anaerobia. La caída del pH en el músculo de

animales se da en forma gradual desde valores de aproximadamente 7 en músculo de animal vivo hasta valores de 5.6-5.7 después de que han transcurrido de 6-8 horas del sacrificio para alcanzar, transcurridas 24 horas, un pH final de 5.3-5.7 (Forrest, 1979).

4.3.2 Capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua (CRA) se define como la capacidad que tiene la carne para retener agua cuando es sometida a fuerzas externas. Esta característica se desea conservar en carne que es sometida a fermentación láctica ya que esta relacionada con la jugosidad. Uno de los problemas que se ha presentado con esta propiedad es su dependencia del pH, en la medida que éste se reduce se genera un exudado excesivo en la carne, que va en detrimento de su calidad (Adams y Hall, 1988). Además de la jugosidad, otras propiedades de la carne como el color y la textura, dependen en cierta medida de la CRA. A nivel químico, la pérdida de la CRA se debe a la reducción de pH de la superficie de la carne por la producción de ácido láctico lo que hace que este se aproxime a los valores del punto isoeléctrico de las proteínas, donde la carga neta es cero y por lo tanto no se puede retener agua mediante enlaces electrostáticos. También influye en la pérdida de la CRA el efecto estérico, debido a la asociación de las proteínas por la rigidez cadavérica que provoca la ausencia de espacio dentro de la red de proteínas donde se pueda retener agua (Lawrie, 1985).

4.3.3 Color

La primera y más importante impresión que tienen los consumidores de los productos cárnicos es el color. Éste está determinado en carne fresca por la proporción y distribución de la mioglobina, pigmento proteínico que proporciona el color rojo característico (Seideman y col., 1984).

La mioglobina es el pigmento principal del músculo esquelético, aunque también se encuentran cantidades importantes de hemoglobina y otros pigmentos como la catalasa y los citocromos-enzimas, siendo su contribución al color menor (Forrest, 1979).

En el tejido muscular donde se ha llevado a cabo un sangrado adecuado, la mioglobina constituye 80-90% del pigmento total.

La mioglobina está formada por una porción proteica denominada globina y una porción no proteica, el grupo hemo que contiene en su parte central una molécula de hierro de suma importancia debido a que de su estado de oxidación dependerá la coloración final adquirida por la carne. Cuando el hierro está oxidado (estado férrico) no puede combinarse con otras moléculas, incluyendo el oxígeno. Si se encuentran en estado reducido (estado ferroso) se combina fácilmente con el agua o con el oxígeno. El color deseable en carne se debe a que es más conveniente tener la molécula de hierro en su estado reducido para que interaccione con el oxígeno y produzca la coloración rojo intenso deseable en la carne (Forrest, 1979). Este pigmento oxigenado se denomina oximioglobina.

En carne empacada al vacío, donde existen cantidades pequeñas de oxígeno, el hierro del pigmento se oxida, cambiando a un color marrón. Esta forma del pigmento se denomina metamioglobina (Fig. 1). El color puede representar un problema debido a que los consumidores asocian un cambio de color con un período largo de almacenamiento, a pesar de que el color puede cambiar en un período de tiempo corto.

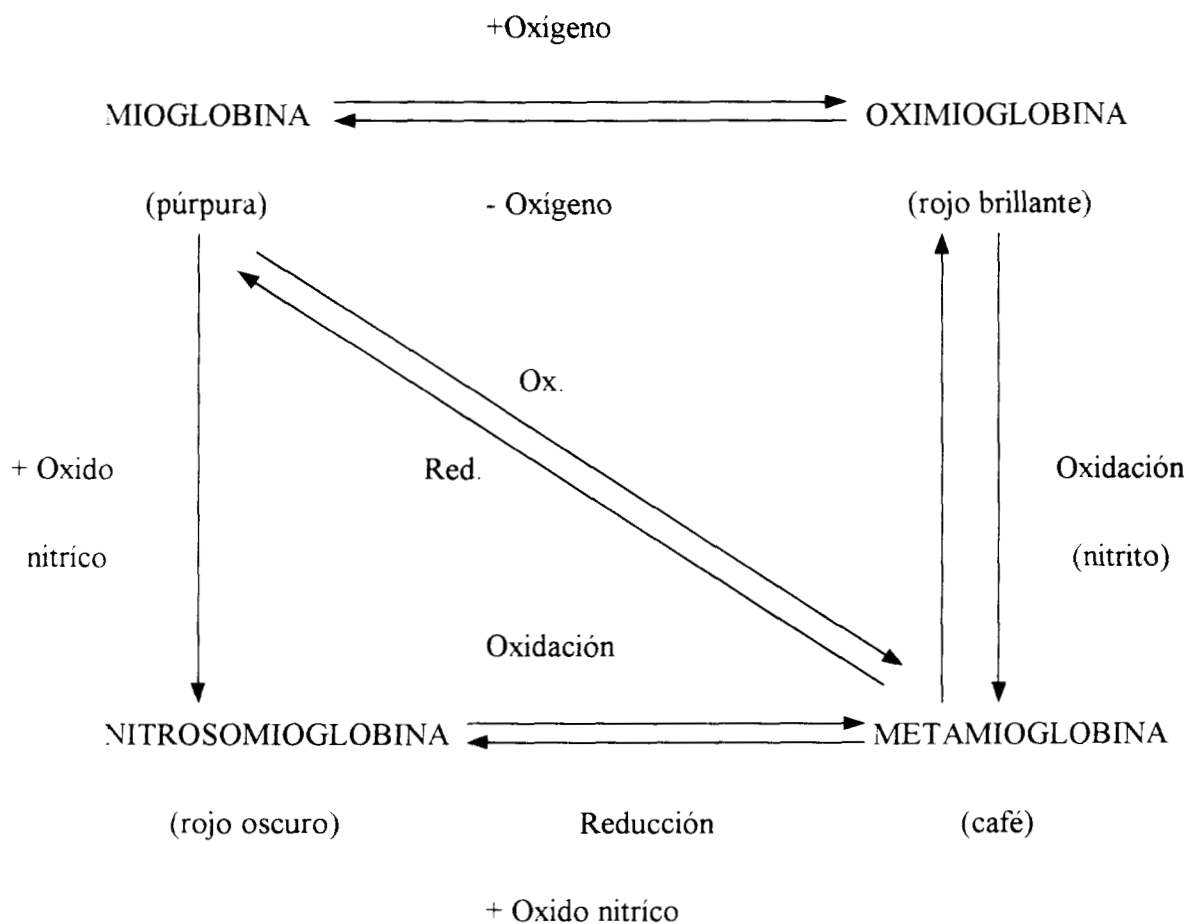


Fig. 1 Pigmentos en carne cruda.

4.3.4 Textura

La textura se define como una propiedad relacionada con los elementos estructurales de la carne y que pueden ser detectada por medio de los sentidos fisiológicos.

En esta tesis se evaluó la blandura de la carne, que es el resultado de la suma de las propiedades mecánicas de los diversos tejidos del músculo esquelético. La estructura de las proteínas miofibrilares es uno de los componentes más importantes de la textura de la carne,

todos aquellos procesos que impliquen la unión de la molécula de actina con miosina producen dureza.

El proceso de ablandamiento de la carne puede dividirse en varias etapas. Inicialmente después del sacrificio de los animales tiene lugar en el músculo el *rigor mortis* o rigidez cadavérica. La carne bajo estas condiciones pierde la característica de extensibilidad, la recuperación de la misma se le conoce como resolución del *rigor mortis*, donde la carne sufre un proceso de ablandamiento debido a dos mecanismos. El primero es debido a la actividad de enzimas endógenas como las calpainas y catepsinas responsables del ablandamiento de la carne por hidrólisis de las proteínas miofibrilares a nivel de las miofibrillas y estructura del tejido conectivo (Toldrá y Etherington, 1988). El segundo mecanismo lo constituyen las enzimas proteolíticas producidas por la flora bacteriana de la superficie de la carne.

Otro factor que influye en la textura es el grado de la capacidad de retención de agua, la carne que tenga una gran proporción de agua ligada es firme y posee una estructura densa, por el contrario, la carne con escasa capacidad de retención de agua es blanda, de estructura laxa y textura húmeda (Lawrie, 1985).

4.4 CAMBIOS DURANTE LA DESCOMPOSICIÓN DE LA CARNE

Los cambios fisicoquímicos que sufre la carne pueden alterar su calidad hasta el grado de hacerla inaceptable para el consumo humano, estos cambios relacionados con la descomposición se deben principalmente a la actividad metabólica de la microflora patógena y de descomposición presente en su superficie, además de modificaciones debidas a la oxidación de lípidos y pigmentos y a su actividad enzimática endógena. La carne, en este sentido, es altamente percedera debido a sus características biológicas y composición química (Guerrero, 1993).

MacMeekin (1982) menciona a las *Pseudomonas* como un género importante en la descomposición de carne almacenada en condiciones aerobias y refrigeración. Estas bacterias utilizan la glucosa como fuente de carbono y cuando ésta se agota, atacan a los aminoácidos, produciendo de esta forma olores desagradables por la formación de sulfuros, ésteres, ácidos, etc. Por otra parte *Brochothrix thermosphacta* es otra de las bacterias importantes en la descomposición de carne. Debido a su actividad metabólica produce una serie de compuestos a partir de la glucosa, como acetoina, ácido acético, ácido isobutírico y ácido isoválerico, que también generan mal olor (Dainty y Hibbard, 1983).

Dainty (1981) reporta una serie de etapas en el proceso de descomposición, inicialmente en la carne se presenta la generación de olores debidos a la acetoina, diacetilo y 3-metil butanol producidos por el metabolismo de *Brochothrix thermosphacta* cuando éste se encuentra en cantidades del orden de 10^8 ufc/g. Posteriormente el olor desagradable se debe a la formación de ésteres de ácidos grasos de cadena corta, producidos por *Pseudomonas*. Cuando éstas alcanzan un nivel de 10^9 ufc/g se produce un intenso olor azufrado, junto con la formación de limo en la superficie.

Para el caso específico de las bacterias lácticas, la descomposición de la carne por estos microorganismos es secundaria, a menos que logren desarrollarse cepas lácticas productoras de compuestos azufrados. Tal es el caso de algunos géneros de *Lactobacillus*, que producen H_2S a pH bajos en condiciones de anaerobiosis y concentraciones bajas de carbohidratos. Este fenómeno es poco frecuente, sin embargo puede darse en carnes empacadas al vacío y almacenadas durante un período largo de tiempo (Gill, 1986). Las enterobacterias son otro grupo importante de microorganismos que participan en el proceso de descomposición de la carne y pueden desarrollarse en carne almacenada en condiciones inadecuadas de refrigeración. Son microorganismos anaerobios facultativos, que incluyen a patógenos productores de sulfuros, incluyendo H_2S , a partir de aminoácidos. Estos microorganismos pueden desarrollarse en carnes empacadas al vacío, tal es el caso de *Hafnia sp.*, *Serratia sp.*, *Enterobacter sp.*, *Yersinia enterocolitica*, que crecen a

temperaturas de alrededor de 5°C. Si la refrigeración de la carne es inadecuada pueden desarrollarse *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonide* y *Salmonella sp.* En carne almacenada a temperatura mayores a 10°C se presenta el predominio de *Enterobacteriaceae* que provocan olores a putrefacción (Waites, 1988).

Es importante destacar a las aminas biogénicas como un grupo de compuestos indicadores de descomposición. Son sustancias biológicamente activas que se forman por la descarboxilación de los aminoácidos correspondientes, por ejemplo lisina a cadaverina, tirosina a tiramina, arginina a putrescina, etc., a través de la actividad específica de las enzimas derivadas de la flora contaminante de la superficie de la carne, como los géneros *Enterobacteraceae*, *Bacillaceae*, algunas especies de *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Streptococcus* (Edwars y col., 1987).

Los pigmentos de la carne se ven afectados por la descomposición. En carne de cerdo empacada al vacío se producen cambios deteriorativos en el color si se tiene la condición de carne PSE (pálido, suave y exudativo) (Gill y Newton, 1982).

Los lípidos son otros componentes que se alteran por el proceso de descomposición en carne. La oxidación de grasas se acelera por la presencia de pigmentos oxidados y la actividad lipolítica debido a la liberación de lipasas producto del metabolismo microbiano involucrado en la degradación de los ácidos grasos (Greer, 1989).

4.4.1 Factores intrínsecos

En la descomposición de la carne están implicados una serie de factores, entre los que puede destacarse la concentración y disponibilidad de nutrientes, determinantes en el crecimiento de microorganismos patógenos y de descomposición, así como el pH, el potencial redox, y la actividad de agua.

El pH de la carne es una determinante ecológica en el crecimiento de la flora de descomposición de la carne. De acuerdo con Lawrie (1985) muchas de las bacterias de descomposición tienen un pH óptimo de crecimiento de alrededor de 7 y no pueden crecer a valores menores de 4 y mayores de 9. Sin embargo los hongos toleran un valor más amplio de 2 a 8 y las levaduras de 4 a 4.5.

El potencial redox se define como la capacidad reductora y oxidante de un sistema. Este parámetro limita el crecimiento de bacterias debido al aumento de la fase lag inicial de los microorganismos. En carne, los microorganismos aerobios se ven favorecidos en su crecimiento por un potencial redox alto, mientras que un potencial redox bajo favorece el desarrollo de microorganismos anaerobios. Es importante mencionar que los microorganismos facultativos pueden crecer tanto en potencial redox alto como bajo (Lawrie, 1985).

La carne fresca frecuentemente tiene una a_w muy cercana a valores de 0.99, por lo que se ve favorecido el crecimiento de un variedad amplia de microorganismos. En carnes empacadas al vacío donde se tiene una baja tensión de oxígeno se puede inhibir el crecimiento de ciertos microorganismos, por ejemplo *Staphylococcus aureus*, que crece a una a_w de 0.89 en condiciones aerobias, mientras que crece a una a_w arriba de 0.90 en condiciones anaerobias (Lawrie, 1985).

Por último la composición de la carne, elevada en proteínas (Tabla 3) favorece el crecimiento de microorganismos que provocan su descomposición (Guerrero, 1993).

4.4.2 Factores extrínsecos

De entre los factores extrínsecos que determinan el proceso de descomposición en carne la temperatura es uno de los más importantes (Haynes, 1993). Los microorganismos se clasifican en función de la temperatura de crecimiento en psicrófilos, que crecen en un

intervalo de -2°C a 7°C, mesófilos de 10°C a 40°C y termófilos de 43°C a 60°C aproximadamente (Forrest, 1979).

La refrigeración inhibe a los microorganismos mesófilos como *Brucella* y *Salmonella* (García y col., 1995) y bacterias mesófilas productoras de toxiinfecciones alimentarias como *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Campilobater sp.*, *Escherichia coli* enterohemorrágico y *Listeria monocytogenes* (Carballo y López, 1991; Guerrero, 1993), aunque se produce el predominio de *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Moraxella* además de especies anaerobias facultativas como enterobacterias psicrótrofas, *Aeromonas sp.*, *Alteromonas putrefaciens* y microorganismos Gram-positivos como *Lactobacillus sp.*, y *Brochothrix thermosphacta* (García y col., 1995).

La humedad relativa es otro de los factores extrínsecos que influyen en el desarrollo de los microorganismos de descomposición en carne. La humedad óptima para conservar la carne varía en función de la temperatura de almacenamiento. Por ejemplo el crecimiento de los microorganismos en la superficie de la carne es diez veces mayor cuando la carne está húmeda, que sobre la superficie seca a una temperatura de 2 a 3°C y cinco veces mayor a una temperatura de entre 7 y 20°C (Lawrie, 1985).

Los aditivos químicos son importantes para detener el deterioro de la carne debido a la microflora contaminante. Entre otros se emplean el cloruro de sodio, los nitritos y los nitratos. (Badui, 1991). La deshidratación también puede ser una determinante ecológica en la descomposición de la carne, ya que se puede producir una pérdida de agua que limita el crecimiento de flora bacteriana (Lawrie, 1985).

Las atmósferas modificadas y el envasado al vacío (sección 4.5.1) limitan el crecimiento de los microorganismos aerobios, principalmente *Pseudomonas* (Guerrero y Taylor, 1994).

La fermentación láctica, que es objeto de estudio en esta tesis (sección 5.2) actúa también como una barrera ecológica en el proceso de descomposición de la carne, aumentando su vida

útil mediante la inhibición de microorganismos patógenos y de descomposición (Guerrero y Taylor, 1994).

4.5 ALTERNATIVAS DE CONSERVACIÓN DE LA CARNE

Teniendo en cuenta la gran cantidad de microorganismos que pueden proliferar en la carne y provocar su descomposición, es necesario contar con condiciones adecuadas de matanza, manipulación, almacenamiento y conservación para incrementar su vida útil. De entre los diferentes métodos de conservación usados en la industria cárnica, la refrigeración es el más generalizado, utilizándose temperaturas de alrededor de 4°C lo que permite conservar la carne por aproximadamente dos semanas (Haynes, 1994). Actualmente dentro de los métodos de conservación que junto con la refrigeración aumentan la vida media de la carne y garantizan su calidad sanitaria, cabe destacar la utilización de atmósferas modificadas, el empaque al vacío, la acción de bacterias lácticas y bacteriocinas, la descontaminación fisicoquímica y la irradiación.

4.5.1 Atmósferas modificadas

La conservación mediante el uso de las atmósferas modificadas persigue principalmente limitar el crecimiento aerobio de bacterias de descomposición como las *Pseudomonas sp.* aerobios estrictos y *Brochothrix thermosphacta*, microorganismo que bajo condiciones anaerobias tiene un bajo potencial de descomposición en carne (Guerrero y Taylor, 1994).

El envasado en atmósferas modificadas consiste en la introducción de la carne en bolsas impermeables al aire e insuflar la mezcla de gases seleccionada. Por otro lado envasado al vacío se considera como un tipo de atmósfera modificada (Stiles y Hastings, 1991) en el que se elimina aire por medio de vacío y se realiza un sellado hermético de los envases.

Dentro de las ventajas del uso de las atmósferas modificadas, está el aumento en la vida útil de la carne desde un 50 hasta un 400% (García y col., 1995).

Los principales gases utilizados en la conservación de la carne mediante las atmósferas modificadas son CO₂, O₂ y N₂ en forma individual o combinados. En el caso de la carne envasada al vacío el oxígeno residual se consume rápidamente debido a la actividad metabólica de los microorganismos y a la respiración muscular. Bajo estas condiciones se alcanza al cabo de unos dos días niveles de CO₂ del orden de 20-30% (Waites, 1988) por esto el envasado al vacío se considera como un tipo de atmósfera enriquecida con CO₂.

El CO₂ tiene un efecto inhibitor selectivo, siendo especialmente sensibles las bacterias psicrótrofas aerobias Gram-negativas y los mohos, mientras que las bacterias lácticas, *Enterobacteriaceae*, *Brochotrix thermosphacta* y las levaduras son tolerantes (Stiles, 1996). La temperatura de almacenamiento también influye en el efecto inhibitorio del CO₂, se ha reportado que las temperaturas bajas disminuyen la solubilidad del CO₂ y por consiguiente se reduce el efecto bacteriostático (Parry, 1993). La concentración óptima de CO₂ recomendada para la conservación de la carne es de alrededor del 20-30% (Stiles y Hastings, 1991) los demás componentes pueden ser aire, oxígeno o una mezcla de O₂ y N₂.

Una desventaja de la aplicación del envase al vacío, es que éste se limita a carnes que tengan un pH menor de 6. Se sabe que en las carnes de corte oscuro, donde se presentan valores de pH mayores de 6, se favorece el crecimiento de bacterias productoras de H₂S generándose de esta forma malos olores y sulfomioglobina causante de la decoloración verde de la carne (Erichsen y Molin, 1994).

4.5.1.1 Microflora en carne envasada al vacío

El incremento en la vida útil de la carne envasada en atmósferas modificadas con una alta concentración de CO₂ se debe a un cambio en la flora microbiana dominante con respecto a la envasada en aerobiosis.

Konings y Otto (1983) reportaron que las bacterias lácticas en carne envasada al vacío y almacenada entre 0 y 5°C no producen olores ni sabores desagradables, conservando la carne aproximadamente de 21-28 días, mientras que la vida útil de la carne envasada en atmósferas enriquecidas con O₂ y CO₂ es de alrededor de 7-10.

La flora microbiana aerobia presente en las carnes envasadas al vacío es inhibida por los altos niveles de CO₂, principalmente se detiene el crecimiento de las *Pseudomonas sp.*, que bajo condiciones aerobias llegan a constituir más del 90% de la flora en carne refrigerada. Sin embargo son necesarios pH bajos en la superficie cárnica para inhibir el crecimiento de *Enterobacteriaceae* y anaerobias facultativas. Gill y Penney (1986) señalan que durante el almacenamiento de carne de res a 1°C empacada al vacío la flora de descomposición dominante fueron las bacterias del género *Enterobacteriaceae* y *Lactobacillus*.

Por otro lado en carne envasada al vacío se favorece la proliferación de la flora láctica, predominando los microorganismos del género *Lactobacillus*, aunque frecuentemente se encuentran otras bacterias lácticas como *Leuconostoc sp.* y *Carnobacterium* (Dainty y Mackey, 1992). Algunas cepas de bacterias lácticas aisladas de una gran variedad de carnes empacadas al vacío son capaces de producir sulfuro de hidrógeno (Shay y col., 1988). Estos autores mencionan que *Leuconostoc mesenteroides* parece estar relacionado con el deterioro del color de la carne de res envasada al vacío.

La carne con pH alto, empacada al vacío se descompone rápidamente debido a la actividad de bacterias del género *Enterobacteriaceae* y microorganismos anaerobios facultativos como las *Alteromonas putrefaciens* y *Brochothrix thermosphacta* (Gill y Penney, 1986).

Un aspecto importante a considerar en el uso de atmósferas modificadas, es la temperatura de almacenamiento, debido a que la efectividad de las atmósferas disminuye cuando la temperatura supera el intervalo de la refrigeración de 0 a 5°C. Hood y Mead, (1993) reportan que cuando la carne es mantenida a temperaturas entre 5 a 12°C proliferan microorganismos patógenos como *Salmonella sp.*, *E. coli* enterohemorrágico, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*. Por lo anterior es necesario en el uso de atmósferas modificadas un control estricto de la temperatura de almacenamiento, la cual debe estar lo más cercano posible a 0°C. Para temperaturas superiores se recomienda la sustitución de la flora natural presente en la carne por una flora de bacterias lácticas que inhiban el desarrollo de los microorganismos patógenos y de descomposición presentes en la carne.

5.2 Fermentación láctica

El uso de bacterias lácticas en los alimentos tiene una amplia historia, siendo la fermentación láctica uno de los métodos más antiguos en la conservación de los alimentos. La fermentación láctica es un proceso microbiano muy complejo donde la población de bacterias lácticas llega a ser la microflora predominante (Shirai y col., 1996). En algunos casos además del efecto conservador en el alimento, se obtienen cambios en propiedades sensoriales como el sabor, el color, la textura y el aroma que mejoran la calidad del producto.

Las bacterias lácticas han sido utilizadas tradicionalmente en la elaboración de productos lácteos como el yogurt, algunos quesos y productos cárnicos fermentados como el salami, el peperoni y algunas variedades de salchichas (Guerrero y Arteaga, 1990). Una de las dificultades que se tuvieron inicialmente en la elaboración de productos fermentados fue la regulación del proceso de fermentación para obtener un producto con características agradables y constantes. En forma empírica estos procesos de elaboración se fueron

mejorando hasta poder controlar la fermentación láctica, básicamente mediante la selección del inóculo y la adición en algunos casos de una fuente de carbono, además de la temperatura y el tiempo de fermentación. De este modo se generó una amplia gama de posibilidades en la conservación y elaboración de diferentes productos alimenticios fermentados.

La conservación y elaboración de productos cárnicos también evolucionó, se empezaron a usar cultivos iniciadores de bacterias lácticas capaces de predominar sobre la microflora natural de la carne, buscando mejorar la calidad del producto obtenido mediante el desarrollo de un mejor color, una mayor consistencia, reducción de la flora patógena y de descomposición, formación de aromas y mejora en el sabor (Shirai y col., 1996).

Recientemente se ha incrementado el uso de atmósferas modificadas en carnes frescas así como el empaque al vacío para aumentar su vida media, debido a que las bacterias lácticas bajo estas condiciones son capaces de predominar, inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas y de descomposición, dando origen de esta forma a productos estables y seguros (Piard y Desmazeaud, 1992; Daeschel y Ray, 1992).

En este sentido varios autores reportan que la estabilidad de los productos sometidos a fermentación láctica se debe a la conversión de los azúcares en ácidos orgánicos, por la actividad metabólica de las bacterias lácticas, siendo éste el principal mecanismo responsable de la actividad antimicrobiana, además de la competencia por el sustrato disponible (Lindgren y Dobrogosz, 1990).

4.5.2.1 Bacterias lácticas

Las bacterias lácticas se clasifican en los siguientes géneros, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* y *Carnobacterium* (Bergey's Manual, 1994).

Estas bacterias comprenden un número elevado de microorganismos Gram-positivos, cuya característica principal es la producción de ácido láctico a partir de carbohidratos. Las bacterias lácticas asociadas con los alimentos incluyen microorganismos del género *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* y bacilos de los géneros *Lactobacillus* y *Carnobacterium* (Collins y col., 1987). Son anaerobias, aerotolerantes, no formadoras de esporas, generalmente no móviles, catalasa negativas, no reductoras de nitratos, tolerantes a la presencia de CO₂, nitritos, humo y concentraciones relativamente altas de sal y valores de pH bajos. Aprovechando estas características, las bacterias lácticas han sido utilizados en carnes empacadas en atmósferas modificadas, incluyendo el empaque al vacío, por su predominio en la flora natural de la carne (McMullen y Stiles, 1996).

Las bacterias lácticas que se encuentran frecuentemente en carne almacenada anaeróbicamente son las pertenecientes al género de *Lactobacillus* que crecen hasta una densidad celular limitada por la disponibilidad de sustrato, que no llega a exceder 10⁸ ufc/cm³ (Dainty, 1981). Aún cuando las bacterias lácticas tienen un efecto conservador en carne, algunos géneros de *Lactobacillus* pueden producir sulfuro de hidrógeno, como resultado de la incapacidad para sintetizar aminoácidos requeridos en la formación de proteínas, por lo que se activa el mecanismo proteolítico, a partir del cual se aprovechan las proteínas presentes en la carne (Ahn y Stiles, 1990). De esta manera las proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas actúan como fuente de nitrógeno, produciendo olores azufrados.

Una característica importante de las bacterias lácticas es su patrón de fermentación, determinante en la selección de la cepa que se desee utilizar como cultivo iniciador en la conservación de la carne fresca. Este se divide en homo y heterofermentativo de acuerdo con la ruta metabólica que se presente y los productos finales formados. Las bacterias lácticas homofermentativas producen ácido láctico a partir de azúcares de seis carbonos, aunque también pueden producir ácido acético y láctico a partir de azúcares de cinco carbonos. A diferencia de éstas, las bacterias lácticas heterofermentativas tienen la

capacidad de utilizar diferentes rutas metabólicas produciendo además de ácido láctico, CO₂, ácido acético, acetaldehído, diacetilo y etanol (Sharpe y Pettipher, 1983). Un esquema de las rutas metabólicas de las bacterias lácticas homofermentativas y heterofermentativas se muestra en la Fig. 2.

Se han seleccionado bacterias lácticas homofermentativas para producir ácido láctico en carne. Buckenhuskes (1993) reporta que las bacterias lácticas heterofermentativas no son las más adecuadas para utilizarse como cultivos iniciadores en carne, debido a que altas concentraciones de ácido acético generan un sabor pungente.

La temperatura óptima de crecimiento también es un factor importante en la selección de la cepa que se desee utilizar para fermentar la superficie cárnica. Salminen y Wrigh (1993) reportan un rango de temperatura de crecimiento de 10 a 45°C en bacterias lácticas, aunque la temperatura óptima de crecimiento depende la especie. Stiles (1996) menciona la dificultad en la selección de las bacterias lácticas para fermentar carne a temperaturas de refrigeración, alrededor de 4°C, reportando como posibles bacterias candidatas para la conservación de carne almacenada bajo estas condiciones a las cepas de *Carnobacterium piscicola* y *Leuconostoc gelidum*. En la presente tesis la temperatura de refrigeración también fue determinante para el crecimiento de las cepas de *Lactobacillus alimentarius* y *Staphylococcus carnosus* (sección 6.2.1).

4.5.2.2 Propiedades antagónicas de las bacterias lácticas

Las bacterias lácticas son capaces de fermentar carbohidratos por diversas rutas metabólicas, obteniendo durante este proceso ácidos orgánicos, principalmente láctico y acético, además de fórmico, los cuales se reporta no son utilizados por las células y se secretan hacia el exterior (Kandler, 1983). Estos ácidos contribuyen al sabor, aroma y textura, así como a la estabilidad de los alimentos debido a la inhibición de microorganismos indeseables.

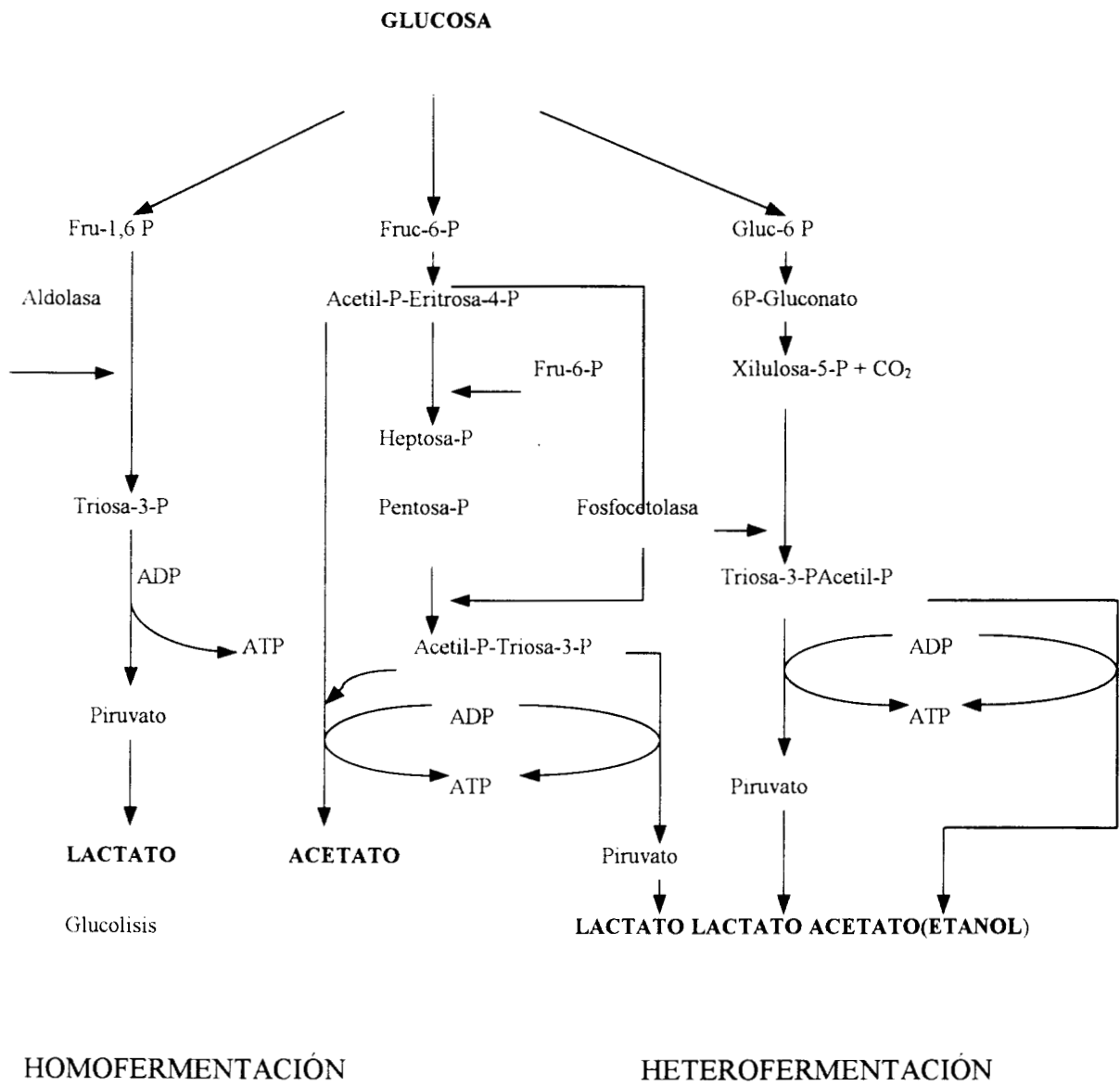


Fig. 2 Representación de las rutas de fermentación de hexosas de las bacterias lácticas (Kandler, 1983).

Varios autores (Konings y Otto, 1983) han investigado el mecanismo de inhibición microbiana del ácido láctico, concluyendo que la disociación del ácido láctico en el medio da origen a la formación de protones y aniones, generando de esta forma un gradiente de protones, viéndose la célula obligada a transportarlos hacia el interior mediante la bomba de protones para evitar la desnaturalización de las enzimas presentes en las estructuras celulares expuestas como la membrana y la pared celular.

Por otra parte el ácido láctico en su forma no disociada tiene la capacidad de atravesar la membrana celular y disociarse dentro del citoplasma. Se ha reportado que bajo estas condiciones este ácido orgánico tienen dos efectos principales: interfiere con funciones celulares como la translocación de sustrato y la fosforilación oxidativa (Baird-Parker., 1980), además que al disociarse dentro del citoplasma provoca un incremento de protones dentro de la célula. Cuando la concentración de protones excede la capacidad buffer de la célula, estos tienden a ser transportados hacia el exterior mediante la bomba de protones, pero cuando las reservas de ATP se agotan se provoca un incremento en la concentración de protones ocasionando un descenso del pH interno lo cual a su vez causa la desnaturalización de las proteínas y la desestabilización de otros componentes celulares, interfiriendo así en la viabilidad celular (Piard y Desmazeaud, 1991).

Una característica importante de las bacterias lácticas es su capacidad de sobrevivir y desarrollarse a valores de pH relativamente bajos, lo cual le da ventajas sobre otros grupos de microorganismos (Smulders y col., 1986). Estas bacterias poseen un sistema simultáneo de transporte de ácido láctico y protones al exterior celular que contribuye a la homeostasis del pH interno y a la producción de energía (Michels y col., 1979; Tseng y Montville, 1993).

Las bacterias lácticas producen además peróxido de hidrógeno como mecanismo de defensa frente al oxígeno mediante la acción de las oxidasas o NADH peroxidasas (Condon, 1987). El H_2O_2 tiene efecto bactericida debido a que es altamente oxidante, provocando la peroxidación de los lípidos de la membrana celular y la destrucción de la estructura básica molecular de proteínas celulares (Dahly y col., 1989).

El diacetilo es un producto de las bacterias lácticas fermentadoras de citrato (Hugeholtz, 1993). Es un compuesto que tiene efecto en concentraciones elevadas, principalmente inhibe a microorganismos Gram-negativos, levaduras y mohos (Jay, 1982). El mecanismo de inhibición está basado en la reacción del grupo α - α' -dicarbonil de la molécula con la porción guanido del aminoácido arginina en enzimas microbianas (alcohol deshidrogenasa, adenilato ciclasa, glutamato deshidrogenasa y transcetolasas) desactivándolas debido a que bloquea o modifica su centro catalítico (Lindgren y Dobrosgosz, 1990).

La reuterina es un compuesto producido específicamente por *Lactobacillus reuterii*, esta bacteria se encuentran principalmente en el tracto gastrointestinal y en productos cárnicos. Este compuesto presenta un amplio rango de inhibición, es activo en microorganismos como *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida* y en algunos protozoos como *Trypanosoma*. Actúa inhibiendo la enzima ribonucleótido reductasa, lo que explica en cierta su amplio espectro de inhibición (Axelsson y col., 1989).

También las bacterias lácticas producen CO_2 que se utiliza como inhibidor de crecimiento microbiano, aunque se desconoce con exactitud el mecanismo antagónico. En general las investigaciones realizadas concluyen que el CO_2 produce un incremento en la fase de latencia y del tiempo de generación de los microorganismos de descomposición de la carne (García y col., 1995).

Recientemente ha despertado interés otro grupo de compuestos producidos por algunas especies de bacterias lácticas, las bacteriocinas. Su importancia radica en que estos compuestos pueden ser utilizados como conservadores naturales en la industria de los alimentos (Hillier y Davidson, 1991) sin embargo tienen la desventaja que la temperatura baja, el pH, el cloruro de sodio y otros componentes de los alimentos pueden afectar considerablemente su estabilidad y producción.

Las bacterias lácticas productoras de bacteriocinas han sido aisladas principalmente de productos lácteos, pescado, carnes empacadas al vacío, o carnes y vegetales fermentados.

De acuerdo con Klaenhammer (1993) las bacteriocinas son proteínas o compuestos proteínicos con actividad antimicrobiana contra especies relacionadas taxonómicamente.

Las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas presentan una serie de características comunes, como la sensibilidad a la acción de enzimas proteolíticas y la tolerancia a elevadas temperaturas y a bajo pH.

Su mecanismo de acción se basa en la formación de poros en la membrana citoplásmica de células sensibles (Klaenhammer, 1993) provocando la pérdida de iones K^+ , ATP y en algunos casos aminoácidos y moléculas pequeñas, esta pérdida origina la disminución en el potencial de la membrana consumo de reservas energéticas celulares descenso en la síntesis de ADN, ARN y proteínas, provocando finalmente la muerte de la célula (Bruno y Montville, 1993).

4.5.2.3 Actividad proteolítica

La actividad proteolítica de las bacterias se refiere a la capacidad que tienen algunas especies para producir enzimas proteolíticas que actúan sobre sustrato cárnico específicamente, las proteínas. En este sentido se tiene una controversia, mientras algunos autores (Toldrá y Etherington, 1988; Klement y col., 1974) reportan que las bacterias lácticas responsables de la fermentación provocan degradación de las proteínas de la carne y que las enzimas endógenas no presentan una participación muy activa en dicha proteólisis, otros autores como Chen y col., (1981) señalan que las bacterias lácticas no muestran una gran actividad proteolítica en alimentos cárnicos fermentados.

Aún cuando las bacterias lácticas se encuentran presentes en muchos alimentos fermentados la significancia de las enzimas proteolíticas no está totalmente entendida en todos los casos. Un sistema bien estudiado es la degradación de las proteínas de la leche, mientras que el proceso similar en carne no es del todo conocido. Reuter (1975) puntualiza que las

bacterias lácticas de productos cárnicos fermentados tienen poca acción sobre las proteínas del músculo porque están altamente estructuradas, limitándose la proteólisis por una serie de factores estéricos. Concluye además que en tal degradación tienen que ver más bien con las enzimas nativas de la carne.

4.5.2.4 Actividad lipolítica

Es muy poca la información disponible con respecto a la actividad lipolítica de las bacterias lácticas. La producción de lipasas por las bacterias lácticas depende de la fase de crecimiento del microorganismo, las condiciones de incubación y la composición del medio. Las lipasas endógenas pueden ser liberadas en cantidades pequeñas después de la lisis de las células, muchas de estas lipasas son activas a pH neutro (Papon y Talon, 1989). La actividad lipolítica en bacterias lácticas se reduce conforme disminuye el pH del medio. La actividad de especies de *Lactobacillus* y *Brochothrix thermosphacta* continúa siendo importante a pH 5.6 y 3 a 7.5°C que corresponde a condiciones frecuentemente encontradas en carne (Papon y Talon, 1988). Algunos géneros de *Lactobacillus* (Sanz y col., 1988) y micrococcos lipolíticos (Selgas y col., 1988) son capaces de hidrolizar los triglicéridos de los ácidos grasos de cadena corta. Por otra parte los estafilococos lipolíticos, dentro de los que se incluyen cadenas de *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus xilosus* y *Staphylococcus sciuri* muestran una actividad lipolítica muy débil (Schleifer, 1986).

4.6 TÉCNICAS ANALÍTICAS EMPLEADAS

Dentro las técnicas de laboratorio empleadas en los análisis bioquímicos se cuenta con una amplia variedad que pueden ser aplicadas a sistemas biológicos. Éstas se emplean para varios objetivos entre otros: a) aislamiento y separación de compuestos, b) determinación de

peso molecular c) caracterización de diferentes aspectos de la estructura de los compuestos d) evaluación de pureza de los compuestos.

La característica que diferencia a los métodos de separación es la interacción entre la fase estacionaria y los componentes de la muestra. Esta interacción generalmente se basa en uno de los principios siguientes: intercambio iónico, solubilidad, adsorción o filtración. En algunos casos puede utilizarse la combinación de varias interacciones para lograr el análisis deseado.

En esta tesis se utilizaron dos técnicas de análisis bioquímico: la cromatografía de gases y la electroforesis.

4.6.1 Electroforesis

Esta técnica de análisis se fundamenta en el hecho de que algunos polímeros biológicos como las proteínas tienen la capacidad de ionizarse, y cuando son sometidos a un campo eléctrico pueden migrar hacia el polo de carga contraria (Badui, 1991).

En las proteínas la presencia de aminoácidos en forma de iones a un pH determinado hace que esta se desplace hacia el ánodo o cátodo, dependiendo de la carga neta de la proteína y aunque en forma menos significativa, el tamaño y la forma de la molécula (Baduí, 1991). La velocidad o movilidad de migración en el campo eléctrico al que son sometidas las proteínas es característico para cada uno de ellas y se mide con respecto a una sustancia de referencia o inerte reportándose como el valor del R_{fi} .

Para el análisis de proteínas de carne se utiliza el método de electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (Chin-Seng y Parrish, 1979). Este método corresponde a una electroforesis desnaturizante, donde la función del detergente iónico (cargado negativamente) Dodecil Sulfato de Sodio (SDS), es desnaturizar las proteínas, rompiendo la estructura secundaria,

terciaria y cuaternaria mediante la ruptura de los puentes hidrófilos, lo que facilita la migración hidrófoba (Badui, 1991). Este detergente es absorbido en la superficie de las cadenas polipeptídicas confiriéndoles a éstas una carga negativa. Cada polipéptido absorberá una cantidad de SDS proporcional a su tamaño (Bohinski, 1987) formando un complejo SDS-proteína que tienen la misma relación carga-masa dando origen a una movilidad electrofóretica fuerte y un tiempo de separación corto. Otra ventaja es que las velocidades diferentes de migración dependerán del tamaño de polipéptido y no de su carga. Los más pequeños se moverán más rápido que los de menor tamaño a través de la matriz del gel de poliacrilamida (Ching-Seng y Parrish, 1979). Con la electroforesis puede calcularse el peso molecular de distintos compuestos, para lo que se utilizan estándares de peso molecular conocido.

4.6.2 Cromatografía de gases

El principio básico de la cromatografía de gases es la separación de la muestra al tener un flujo ininterrumpido de una fase en movimiento que contiene la muestra por analizar a través de una región de una fase estacionaria la cual por varios medios interactúa en diferentes grados con los componentes de la muestra y así se permite el movimiento diferencial de los componentes individuales de ésta.

La cromatografía se utiliza frecuentemente para separar los componentes físicos de una mezcla. Esta técnica de separación se realiza en dos fases, una móvil y una estacionaria. La fase móvil puede ser un líquido o un gas y la fase estacionaria puede ser un líquido o un sólido. La fase móvil pasa a través de la fase estacionaria, la cual se encuentra en una columna o en un sistema planar y dependiendo de su estructura, adsorbe o absorbe los componentes a separar de la mezcla en cuestión. En la cromatografía de gases, la fase móvil es un gas inerte y la fase estacionaria puede ser un líquido o un sólido (Bohinski, 1987).

Para el análisis de la composición de ácidos grasos por cromatografía de gases es necesario someterlos a un proceso conocido como metilación el cual consiste en realizar una derivatización para formar metil ésteres volátiles a partir de los ácidos grasos libres. Particularmente en esta tesis se utilizó la técnica de transesterificación usando una solución de trifluoruro de boro en metanol, debido que es un reactivo que esterifica rápidamente a los ácidos grasos libres (Christie, 1982) lo que facilita su análisis posterior.

**Quien con el esfuerzo propio
logre llegar hasta la cima
de una primera meta,
para entonces su espíritu
experimentará tal fortaleza
que sentirá la necesidad de
escalar otras cimas superiores.**

Humberto Alpizar Olvera

5.0 MATERIAL Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES

5.1 Preparación de muestras

La carne de cerdo se adquirió en un centro comercial local. Se desconoce la edad, sexo, y las condiciones post-mortem de los animales. Se utilizó músculo largo dorsal (*Longissimus dorsi*) de cerdo, que fue cortado en secciones de aproximadamente 2x2x2 cm, procurando eliminar el exceso de tejido conectivo.

Las cepas empleadas fueron *Staphylococcus carnosus* y *Lactobacillus alimentarius* en forma pura (Ch. Hansen). Estas cepas fueron seleccionadas en base a su capacidad de crecer y disminuir el pH rápidamente sobre la superficie de la carne de cerdo, resultados obtenidos de pruebas realizadas previamente en el Área de Bioquímica de Macromoléculas de la UAM-Iztapalapa. Las cepas liofilizadas fueron activadas en forma individual bajo condiciones de esterilidad, tomando una asada que se introdujo en tubos con rosca que contenían 10 ml de caldo MRS incubándose posteriormente a 37°C durante aproximadamente 24 horas. A partir de esta suspensión se tomaron 5 ml que se vaciaron en 45 ml de caldo MRS, dejándose nuevamente bajo condiciones de incubación a 37°C durante 24 horas hasta que el inóculo alcanzó una densidad óptica = 1 medida a 640 nm (Ramírez y col., 1994) en un espectrofotómetro Beckman DU modelo 650 (California, E.U.). Posteriormente a la suspensión celular se le adicionó 4% de glucosa para favorecer el crecimiento de las bacterias lácticas y la promoción de la fermentación láctica en la carne de cerdo (Guerrero y col., 1995). En esta solución se inocularon las muestras por inmersión durante 10 minutos, eliminándose posteriormente por decantación el exceso de suspensión. Una tercera parte de las muestras se inóculo con cada cepa, y la tercera parte restante se utilizó como control. La carne se empacó al vacío en bolsas Cryovac LB-50 en una empacadora de vacío Multivac D-8941 (Koch, Kansas City, E.U.) a una presión de vacío de -700 mBars. Posteriormente las muestras se almacenaron en refrigeración a una temperatura de 4°C. También se evaluó la temperatura de 19°C debido a que a valores mayores el

crecimiento de microorganismos de descomposición se incrementa rápidamente (Guerrero y Taylor, 1994). La carne se almacenó durante un período de tiempo de 96 horas.

5.2 EVALUACIÓN FÍSICOQUÍMICA

5.2.1 Medición de pH

Cada 24 horas se midió el pH de acuerdo con el método reportado por Raveendran y col. (1993) en un potenciómetro Conductronic 20 (Fisher, México). Se picaron 10 g de muestra, a las que se les adicionaron 90 ml de agua destilada, posteriormente se realizó un homogenizado en una licuadora doméstica a máxima velocidad, durante aproximadamente 30 segundos. La muestra fue filtrada con gasa para eliminar el exceso de tejido conectivo. A partir de esta solución se tomaron 10 ml a los cuales se les midió el pH por introducción directa del electrodo en la misma. Cada medición se realizó por triplicado.

5.2.2 Cuantificación de acidez total titulable

A partir del homogenizado obtenido en la medición del pH, se tomaron 10 ml, los cuales fueron titulados con una solución de NaOH 0.1 N previamente valorada. A cada muestra se le agregaron 3 gotas de fenolftaleína como indicador. Cada medición se repitió por triplicado, reportándose la acidez como por ciento de ácido láctico, con la siguiente fórmula (Guerrero y Arteaga, 1990):

$$\% \text{Ácido láctico} = \frac{V_{\text{NaOH}} \times N_{\text{NaOH}} \times \text{Meq}_{\text{Ac. Láctico}} \times f \times 100}{\text{peso de la muestra}}$$

5.2.3 Capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua fue evaluada cada 24 horas, mediante una modificación al método de centrifugación reportado por Wardlaw y col. (1973). A partir de las muestras empacadas al vacío y almacenadas a temperatura de 4 y 19°C se tomaron 5 g los cuales se picaron finamente y se introdujeron en un tubo de centrifuga, se añadieron 8 ml de una solución de NaCl 0.6 M, agitándose durante 1 minuto. Los tubos se colocaron en un baño de hielo durante 30 minutos. Las muestras fueron agitadas durante 1 minuto antes de ser centrifugadas a 1000 rpm durante 15 minutos a 4°C en una centrifuga Beckman J2-MI (Beckman Inc., Palo Alto, Cal. E.U.) con un rotor No. 14. El sobrenadante fue decantado, en una probeta de 10 ml. El volumen retenido de la solución 0.6 N de NaCl fue reportado como la cantidad de agua retenida por gramo de peso de la muestra de carne. Cada medición se realizó por triplicado.

5.2.1 Color

Se realizó una evaluación instrumental del color cada 24 horas, con el sistema L,a y b de acuerdo con lo reportado por Ferreira y col. (1994). Se utilizó un colorímetro Minolta (Chroma Meter CR-200, Japan 80025393, Tokio, Japón) usando como blanco una tarjeta con los siguientes valores de referencia $L = 97.38$, $a = -0.17$ y $b = 1.94$. A partir de las muestras empacadas al vacío y almacenadas a temperatura de 4 y 19°C se tomaron cortes de carne con un diámetro de aproximadamente 6-8 cm y se procedió a valorar el color con la pistola a una distancia de 2 cm de la carne. Las mediciones se realizaron por triplicado, reportándose los resultados como el vector Diferencia Total de Color ΔE (Fig. 2).

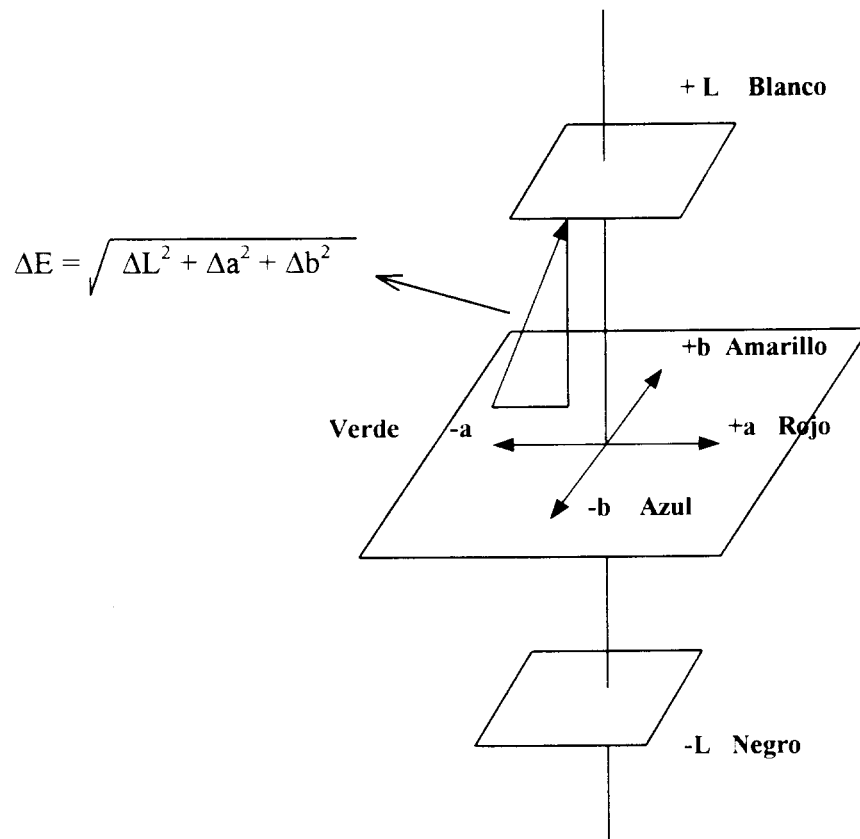


Fig. 3 Esquema del color en un espacio en tres dimensiones.

5.2.4 Textura

La medición de la textura se realizó mediante una prueba de compresión cada 24 horas, con un Texturómetro Instron Modelo 4502 (Canton, Mass. E.U.). A partir de la carne empacada al vacío y almacenada a temperatura de 4 y 19°C se tomaron muestras en forma de cubo de aproximadamente 2 x 2 x 2 cm, sobre las que se aplicó una fuerza de 10 N a una velocidad de 10 mm/min en forma perpendicular a la dirección de las fibras. Las mediciones se realizaron por triplicado, reportándose los resultados como la fuerza en Newtons necesaria para comprimir la carne en un 50%.

5.3 EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA

5.3.1 Crecimiento de bacterias lácticas

El crecimiento de bacterias lácticas se evaluó cada 24 horas durante las 96 horas de almacenamiento en agar MRS (Woolthuis y col., 1984). En condiciones de esterilidad se tomaron 10 g de carne de las muestras almacenadas a temperatura de 4 y 19°C que se vaciaron en 90 ml de agua peptonada (0.85% de NaCl + 1% de peptona de carne), posteriormente se realizó un homogenizado en una licuadora doméstica a máxima velocidad, durante aproximadamente 30 segundos. Esta solución fue tomada como la dilución 10^{-1} a partir de la cual se obtuvieron las diluciones necesarias. De cada dilución se tomaron 0.1 ml que fueron vaciados en cajas de Petri con el medio de cultivo. Las muestras se incubaron a 37°C durante 24 o 48 horas como se muestran en la Tabla 6, hasta obtener crecimiento de colonias de bacterias lácticas. Los resultados se reportan como ufc/g. Cada medición se realizó por duplicado.

Tabla 6. Condiciones de incubación para el análisis de bacterias lácticas.

Muestra	Condiciones de incubación	
	Temperatura (°C)	Tiempo (h)
Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i> y almacenada a 4°C	37	48
Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i> y almacenada a 4°C	37	48
Carne sin inóculo y almacenada a 4°C	37	48
Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i> y almacenada a 19°C	37	24
Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i> y almacenada a 19°C	37	24
Carne sin inóculo y almacenada a 19°C	37	48

5.3.2 Crecimiento de *Enterobacteriaceae*

El crecimiento de *Enterobacteriaceae* se evaluó cada 24 horas durante las 96 horas de almacenamiento en agar RVB (Agar de bilis y rojo violeta, Bioxon) (Grau, 1983). En condiciones de esterilidad se tomaron 10 g de carne de las muestras almacenadas a temperatura de 4 y 19°C que se vaciaron en 90 ml de agua peptonada (0.85% de NaCl + 1% de peptona de carne), posteriormente se realizó un homogenizado en una licuadora doméstica a máxima velocidad, durante aproximadamente 30 segundos. Esta solución fue tomada como la dilución 10^{-1} a partir de la cual se obtuvieron las diluciones necesarias. De cada dilución se tomaron 0.1 ml que fueron vaciados en las cajas de Petri con el medio de cultivo. Las muestras se incubaron a 37°C durante 24 o 48 horas como se muestran en la Tabla 7, hasta obtener crecimiento de colonias de *Enterobacteriaceae*. Los resultados se reportan como ufc/g. Cada medición se realizó por duplicado.

Tabla 7. Condiciones de incubación para el análisis de *Enterobacteriaceae*.

Muestra	Condiciones de incubación	
	Temperatura (°C)	Tiempo (h)
Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i> y almacenada a 4°C	37	48
Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i> y almacenada a 4°C	37	48
Carne sin inóculo y almacenada a 4°C	37	48
Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i> y almacenada a 19°C	37	48
Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i> y almacenada a 19°C	37	48
Carne sin inóculo y almacenada a 19°C	37	24

5.4 EVALUACIÓN DE PROTEÓLISIS Y LIPÓLISIS EN CARNE

5.4.1 Perfil electroforético de proteínas miofibrilares

A las 0, 48 y 96 horas de almacenamiento se realizaron extracciones de las proteínas miofibrilares por solubilidad en soluciones de diferentes fuerza iónica, de acuerdo con la técnica reportada por Alanis (1997). La carne se mezcló con una solución amortiguadora de fosfato de potasio 10 mM pH =7 y NaCl 0.1 M + MgCl₂ 2 mM + EDTA 1 mM + Ditiotreitól 0.5 mM y se homogenizó en una licuadora convencional. El homogenizado se centrifugó a 9000 rpm durante 20 minutos a 4°C en una centrifuga Beckman J2-MI (Beckman, Palo Alto, Cal. E.U.) con un rotor No. 14. Después de desechar el sobrenadante, se repitió el paso anterior. El precipitado se resuspendió en una solución amortiguadora de fosfato de potasio 50 mM a pH=6 y NaCl 0.6 M + MgCl₂ 5 mM + Na₂P₂O₇ 0.5 mM. La muestra fue centrifugada nuevamente a las mismas condiciones anteriores, descartándose el precipitado. El sobrenadante obtenido se diluyó con agua destilada hasta obtener una fuerza iónica de 0.1. La solución obtenida fue nuevamente centrifugada a 9000 rpm durante 25 minutos resuspendiendo las proteínas en una solución amortiguadora de fosfato de potasio 50 mM a pH=6 y NaCl 0.6 M.

Se determinó la concentración de proteína en las diferentes fracciones con el fin de homogenizar la cantidad de proteína inyectada en los geles de electroforesis a un valor de aproximadamente 10 mg/ml. Se cuantificó la concentración de proteína de acuerdo con el método reportado por Gornall y col. (1948). En un tubo de ensayo se tomó un volumen de 1 ml de la fracción miofibrilar extraída previamente adicionándose 3 ml del Reactivo Biuret. Los tubos se dejaron reposar durante 30 minutos y se leyeron en un espectrofotómetro Beckman DU modelo 650 a 540 nm, utilizando la solución amortiguadora de fosfato de potasio 50 mM a pH=6 y NaCl 0.6 M como blanco.

Las proteínas se guardaron en viales con capacidad de 1.5 ml, colocándose 25 ml de la fracción proteica más 100 ml de buffer muestra (Tris-HCl pH= 6.8 0.5 M, glicerol, SDS 10%, s-b-MCE, azul de bromofenol 0.05%) congelándose a -5°C hasta su uso.

Para analizar las muestras de proteína en los geles de electroforesis estas se prepararon ½ hora antes de usarse. Los viales se calentaron en un baño de agua en ebullición durante 5 minutos y el sobrenadante se inyectó en los geles de electroforesis.

El perfil electroforetico de la fracción miofibrilar fue analizado de acuerdo con el método reportado por Laemmle (1970). Se utilizó un gel de separación del 10% T y un gel de concentración del 4% T en una celda Mini-Protean II (Bio-Rad, Richmond, Cal. E.U.), empleándose volúmenes de muestras con una concentración de 8-10 mg/ml. Se utilizó una mezcla de marcadores de alto peso molecular SDS 6H (Sigma, St. Louis, E.U.) con los siguientes pesos moleculares: anhidrasa carbónica (29,000 Da), albúmina de huevo (45,000 Da), albúmina bovina (66,000 Da), β -galactosidasa (97,400 Da), miosina (205,000 Da).

La fuente de poder fue ajustada a 200 volts, manteniendo este voltaje constante durante aproximadamente 45 minutos. Una vez terminado el análisis, los geles se desmontaron y se tiñeron durante ½ hora en una solución de azul de Comassie R-250 al 0.1%. Posteriormente se destiñeron con una solución de agua-metanol-ácido acético (50%-40%-10% vol/vol). Finalmente los geles fueron sometidos a un barrido por densitometria, utilizando un densitómetro Ultrascan XL de Pharmacia LKB (Bromma, Suiza).

5.4.2 Perfil de ácidos grasos de cadena larga

La metilación de los ácidos grasos de cadena larga se realizó de acuerdo con el método AOAC (1980). A las 0, 48 y 96 horas de almacenamiento se realizaron las extracciones de los ácidos grasos de cadena larga para todos los tratamientos probados. Se picó finamente 0.5 g de carne de las muestras almacenadas a temperatura de 4 y 19°, las cuales se

introdujeron en un sistema de reflujo, agregando perlas de ebullición. A través del tubo del refrigerante se adicionaron 6 ml de la solución 0.5 N de NaOH-Metanol para asegurar la saponificación de los ácidos grasos. Se dejó la carne en ebullición durante 10 minutos, agregándose al final del calentamiento 7 ml de trifluoruro-metanol al 14%. Nuevamente la carne se calentó a ebullición durante 5 minutos. Al final de este tiempo se adicionaron 1.5 ml de hexano. Se dejó en ebullición durante 1 minuto. La muestra fue enfriada en baño de hielo durante 30 minutos. Se adicionó 10 ml de la solución saturada de NaCl. El refrigerante fue retirado y se agregó más solución saturada de NaCl, hasta llevar la fase orgánica al cuello del matraz. Posteriormente se retiró la fase orgánica agregándose aproximadamente 1 g de sulfato de sodio si la muestra presentaba exceso de agua. A partir de estas muestras se tomaron 5 microlitros de la fase orgánica y se inyectaron en el cromatógrafo de gases. Los metil esterios obtenidos fueron analizados por un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer Sigma 3000, Dual FID Chromatograph (Norwalk, Conn., E.U.) con un detector de ionización de flama. La separación de los ácidos grasos se llevó a cabo en una columna de acero inoxidable de 3 m x 1/8" de diámetro, marca DEGS de succinato de dietilenglicol al 15% (Chromosorb WHP-100-120). El análisis se realizó isotérmicamente a una temperatura de 195°C. La temperatura del detector y del inyector fue de 250°C. La velocidad de flujo del gas acarreador (N₂) fue de 43 ml/min (61 psia). La atenuación fue de 8 y la velocidad de la carta 4 mm/min. El tiempo de análisis fue de 35 minutos. Las áreas de los picos fueron calculadas en un integrador automático Perkin-Elmer LC1-100 (Laboratory Computing Integrator Chromatograph, Norwalk, Conn. E.U.). Los esterios metilicos de los ácidos grasos fueron identificados por una mezcla de estándares de referencia de metil esterios SIGMA AOCS No. 6, 0-7631 (Sigma, St. Louis, E.U.) de ácidos mirístico (14:0), palmítico (16:0), palmitoleico (16:1); esteárico (18:0), oléico (18:1) y linolénico (18:3).

A partir de la mezcla de los estándares de ácidos grasos se determinó una curva patrón para cuantificar la concentración de los ácidos grasos de las muestras. Con las condiciones anteriormente mencionadas se inyectaron en el cromatógrafo ácidos grasos de 0.2, 0.4, 0.6,

0.8 y 1 microlitros, obteniendo por ajuste de regresión una curva patrón de área de los diferentes picos obtenidos contra la concentración (Anexo IV).

5.5 Cuantificación de ácido láctico y acético

La técnica empleada para la metilación de los ácidos láctico y acético fue la reportada por Drummond y Shama (1982). El análisis se realizó a las 0, 48 y 96 horas. Se picaron finamente 0.5 g carne de las muestras almacenadas a temperatura de 4 y 19°, mezclándose con 2 ml de metanol y 0.75 ml de una solución de ácido sulfúrico al 50%. La muestra fue incubada en un baño de agua a 50°C durante 30 minutos. Se dejó enfriar la solución, adicionándose posteriormente 1 ml de agua desionizada y 0.5 ml de cloroformo. En un tubo de ensaye se agitó vigorosamente la solución obtenida durante aproximadamente 5 minutos, posteriormente las muestras se centrifugaron a 1350 rpm durante 5 minutos en una centrifuga Beckman J2-MI (Beckman, Palo Alto, Cal. E.U.) con un rotor No. 20. A partir de estas muestras se tomaron 5 microlitros de la fase orgánica y se inyectaron en el cromatógrafo de gases. Los metil ésteres obtenidos fueron analizados por un Cromatógrafo de gases Perkin-Elmer Sigma 3000, Dual FID Chromatograph (Norwalk, Conn., E.U.), con un detector de ionización de flama. La separación de los ácidos láctico y acético se llevó a cabo en una columna de acero inoxidable de 3 m x 1/8" de diámetro, de succinato de dietilen glicol al 15% (Chromosorb WHP-100-120). El análisis se llevó a cabo a una temperatura inicial de 70°C durante 5 minutos, incrementándose hasta 130°C a una velocidad de 6°C por minuto. La temperatura del detector y del inyector fue de 250°C. La velocidad de flujo del gas acarreador (N₂) fue de 43 ml/min (61 psia). La atenuación fue de 32 y la velocidad de la carta 5 mm/min. El tiempo de análisis fue de 20 minutos. Las áreas de los picos fueron calculadas en un integrador automático Perkin-Elmer LC1-100 (Laboratory Computing Integrator, Norwalk, Conn. E.U.).

Para obtener la curva patrón se metilaron ácido láctico (Baker) y acético (Reasol, México), con la técnica anteriormente mencionada, inyectándose posteriormente al cromatógrafo de gases, obteniendo por ajuste de regresión una curva patrón de área de los diferentes picos contra concentración (Anexo III).

5.6 Análisis estadístico

Los resultados se sometieron a un análisis estadístico mediante una prueba de ANOVA, para la comparación múltiple de las medias, y una prueba de Duncan en el paquete estadístico SAS (SAS Institute, 1996). Además se hizo un ajuste de regresión en el paquete Excel Ver.

5.

**Toda investigación científica es una
búsqueda de Dios y la eternidad.**

Stanley Kubrick

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Evaluación fisicoquímica

Como era de esperar con la temperatura de almacenamiento se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0.0001$) sobre las variables pH, acidez total titulable, color, textura, capacidad de retención de agua, crecimiento de bacterias lácticas y enterobacterias, siendo el efecto mayor a la temperatura de 19°C para ambos inóculos de bacterias lácticas. (Anexo I).

6.1.1 Medición de pH

Debido a que la reducción en el pH permite disminuir el crecimiento de microorganismos que provocan la descomposición en carne (sección 4.5.2.2) se evaluó la capacidad de *Lactobacillus alimentarius* y *Staphylococcus carnosus* para reducir el pH de la superficie de la carne, a través de la producción de ácido láctico por la ruta metabólica de fermentación que se muestra en la Fig. 2 para bacterias lácticas homofermentativas.

En la Tabla 17 se presentan las ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) para el pH contra tiempo.

A 4°C se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) entre la muestra control y las inoculadas con las cepas de bacterias lácticas. La carne de cerdo fermentada con *Staphylococcus carnosus* presentó la mayor reducción de pH alcanzando valores de 5.5 a las 96 horas de almacenamiento (Tabla 28).

Es importante destacar la tendencia de reducción de pH (Fig. 4) que a partir de las 48 horas tiende a caer. Este comportamiento puede deberse a la capacidad amortiguadora de la carne de cerdo (Bacus, 1984) que puede mantener hasta ciertos valores el pH aún cuando la concentración de las acidez total titulable (ATT) y el ácido láctico aumenten (Fig. 6 y 20).

Para la temperatura de almacenamiento de 19°C la reducción de pH fue mayor a las 24 horas de almacenamiento, presentando después una tendencia a mantenerse constante durante el resto del tiempo de almacenamiento. *Staphylococcus carnosus* redujo en mayor grado el pH sobre la superficie de la carne, presentado valores de 4.85 a las 96 horas de almacenamiento (Fig. 5).

6.1.2 Cuantificación de acidez total titulable

Se realizó una cuantificación de la acidez total titulable (ATT) reportándola como por ciento de ácido láctico. La fermentación láctica permite aumentar la vida útil de la carne debido a la producción de ácido láctico que tiene un efecto inhibitorio sobre los microorganismos de descomposición de carne (Konings y Otto, 1983).

En la Tabla 18 se presentan las ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) para la ATT contra tiempo.

Como se observa en las Fig. 6 y 7 para ambas temperaturas la tendencia fue a incrementar la ATT durante las primeras 24 horas y posteriormente se presentó una reducción. Esto pudo deberse a la mayor actividad metabólica de las bacterias lácticas al inicio de la fermentación debido a que su crecimiento fue más alto durante las primeras 48 horas de almacenamiento (sección 6.2.1).

La reducción en la ATT también ha sido reportada por otros autores (Borch y Agerhem, 1992; Nychas y Arkoudelos, 1990) quienes mencionan la reducción en la concentración de ácido láctico en carne envasada al vacío.

Una posible explicación a esta tendencia puede ser un cambio en el patrón de fermentación. En las etapas iniciales predominan las bacterias lácticas homofermentativas inoculadas y después empiezan a prevalecer las bacterias lácticas heterofermentativas.

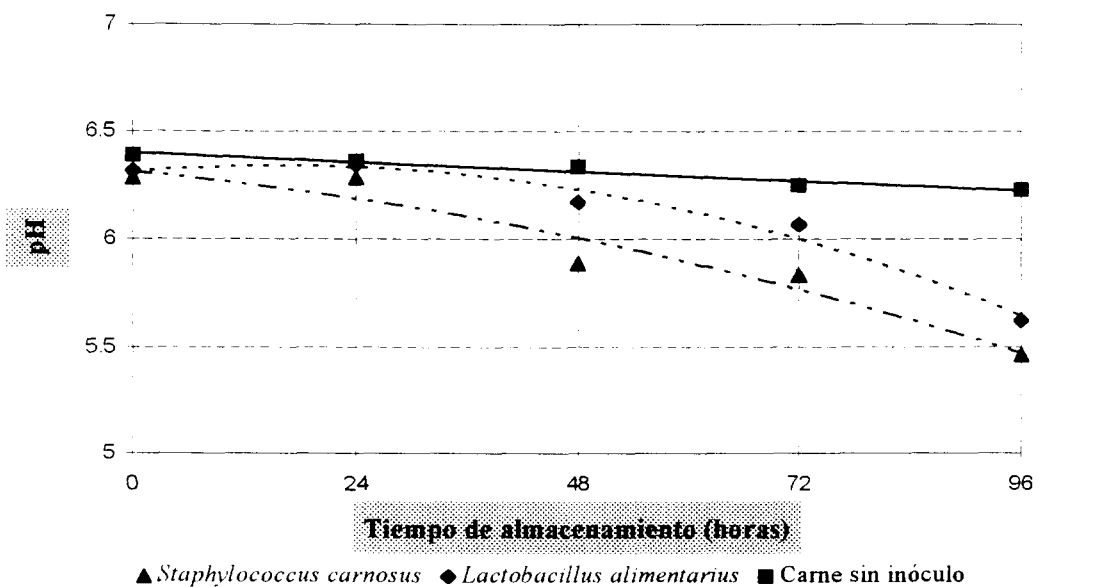


Fig. 4 Cambios en el pH de la carne de cerdo almacenada a 4°C*.

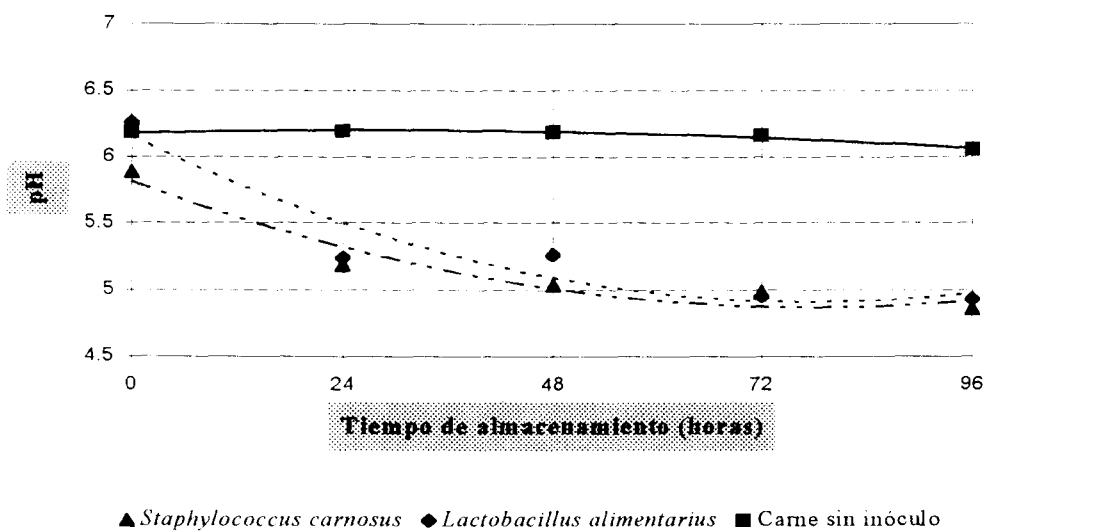


Fig. 5 Cambios en el pH de la carne de cerdo almacenada a 19°C*.

*Cada punto es el promedio de tres mediciones y las desviaciones estándar se encuentran en un rango de 0.015-0.219.

Para determinar con mayor precisión la concentración de ácido láctico se cuantificó este por cromatografía de gases. Asimismo se evaluó la concentración de ácido acético para conocer cual era el patrón de fermentación, discutiéndose los resultados en la sección 6.4.

A 4°C no se encontraron diferencias significativas ($P>0.7393$) entre la muestra control y las fermentadas. La carne inoculada con *Staphylococcus carnosus* produjo un incremento mayor en la ATT hasta las 48 horas de almacenamiento (Fig. 6) a valores hasta de 1.4 % ácido láctico (Tabla 29).

A 19°C se presentó un efecto significativo por el tipo de inóculo ($P<0.0001$) *Staphylococcus carnosus* más eficiente para incrementar la ATT a valores hasta de 1.8 % de ácido láctico (Fig. 7).

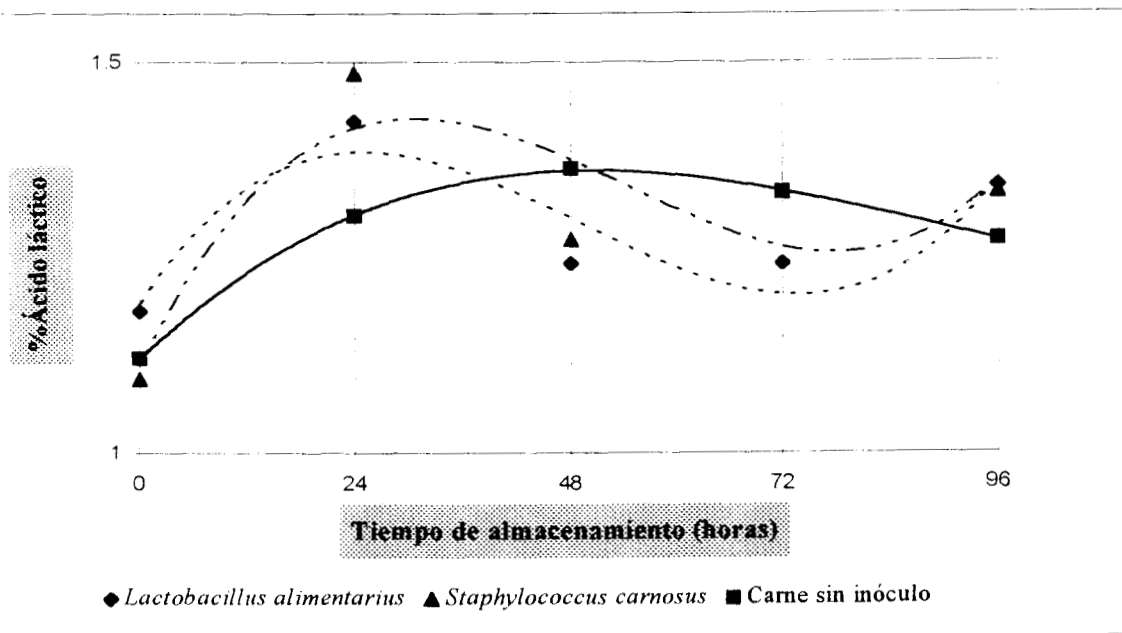


Fig. 6 Cambios en la acidez total titulable de la carne de cerdo almacenada a 4°C*.

* Cada punto es el promedio de tres mediciones y las desviaciones estándar se encuentran en un rango de 0.001-0.189.

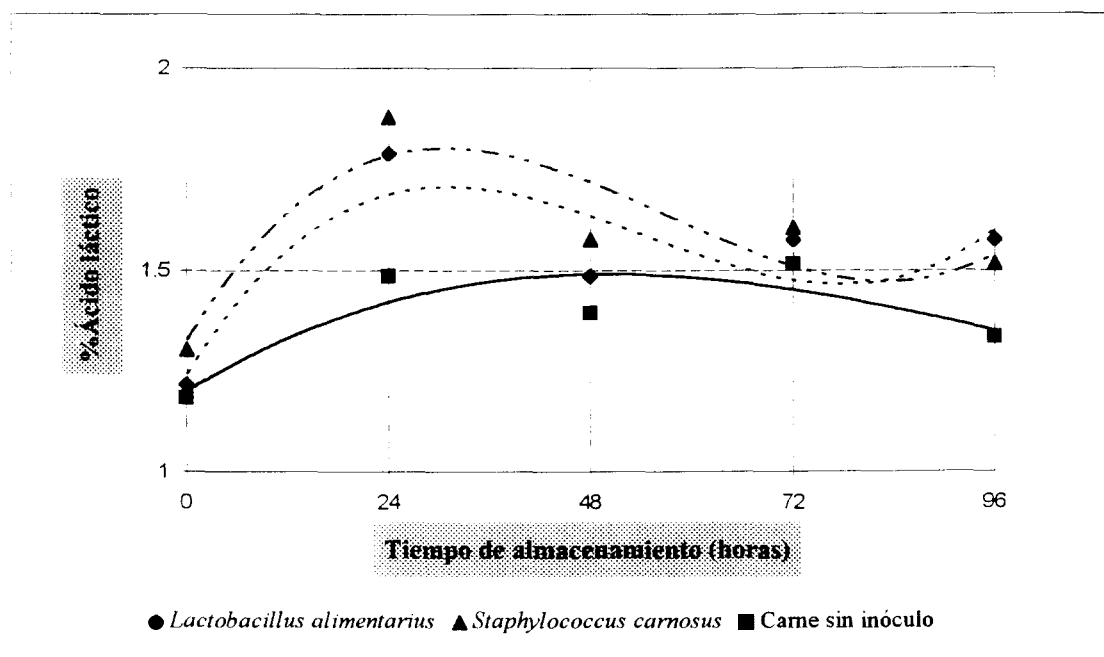


Fig. 7 Cambios en la acidez total titulable de la carne de cerdo almacenada a 19°C*.

* Cada punto es el promedio de tres mediciones y las desviaciones estándar se encuentran en un rango de 0.001-0.189.

6.1.3 Capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua (CRA) se define como la capacidad que tiene la carne para retener agua cuando se le aplican fuerzas externas. Muchas de las propiedades de la carne cruda como el color, la textura, la firmeza, así como la jugosidad y suavidad de la carne procesada dependen de la CRA (Guerrero y Arteaga, 1990). Por lo anterior se evaluó el efecto de la fermentación láctica sobre esta propiedad funcional.

Esta propiedad de la carne que depende principalmente del pH (sección 4.3.2). Se encontró, como se observa al comparar las curvas del pH (Fig. 4 y 5) con las de la CRA (Fig. 8 y 9), un patrón de comportamiento muy similar, a partir del cual se puede mencionar que esta propiedad es dependiente del pH. Estos resultados están acordes a los obtenidos por otros

autores (Ogden y col., 1995). En la Tabla 19 se presentan las ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) para la CRA contra tiempo.

Para las dos temperaturas probadas se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) siendo la carne fermentada y almacenada a 19°C en la que disminuyó en mayor grado la CRA (Tabla 32).

A 4°C se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0421$) entre la carne sin inóculo y la carne fermentada. Siendo *Staphylococcus carnosus* la que produjo mayor reducción de la CRA.

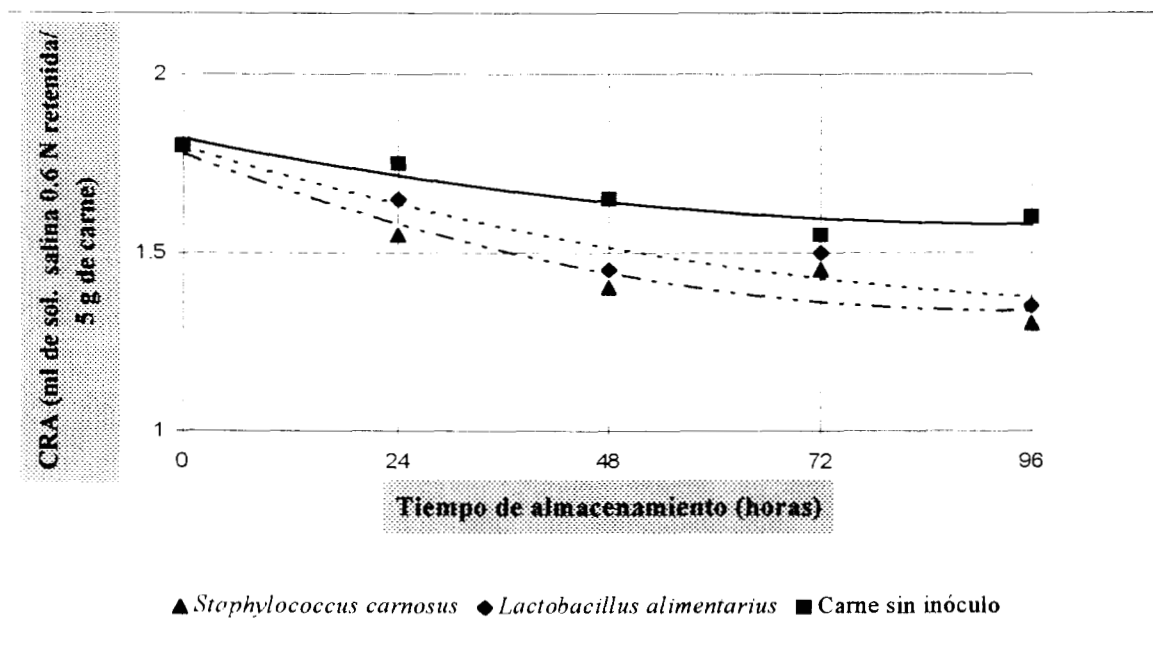


Fig. 8 Cambios en la capacidad de retención de agua (CRA) en la carne de cerdo almacenada a 4°C^* .

* Cada punto es el promedio de dos mediciones y las desviaciones estándar se encuentran en un rango de 0.070-0.353.

A 19°C también se encontró un efecto significativo ($P < 0.0076$) debido al tipo de inóculo. El mayor cambio de la capacidad de retención de agua se obtuvo a partir de las 24 horas de almacenamiento y en muestras inoculadas con *Staphylococcus carnosus*.

La relación existente entre el pH de la carne y la CRA es debida a que cuando se reduce el pH, se aproxima a valores muy cercanos al punto isoeléctrico de las proteínas miofibrilares, donde éstas pierden la capacidad de retener agua por enlaces de puente de hidrógeno, como se explicó en la sección 4.3.2.

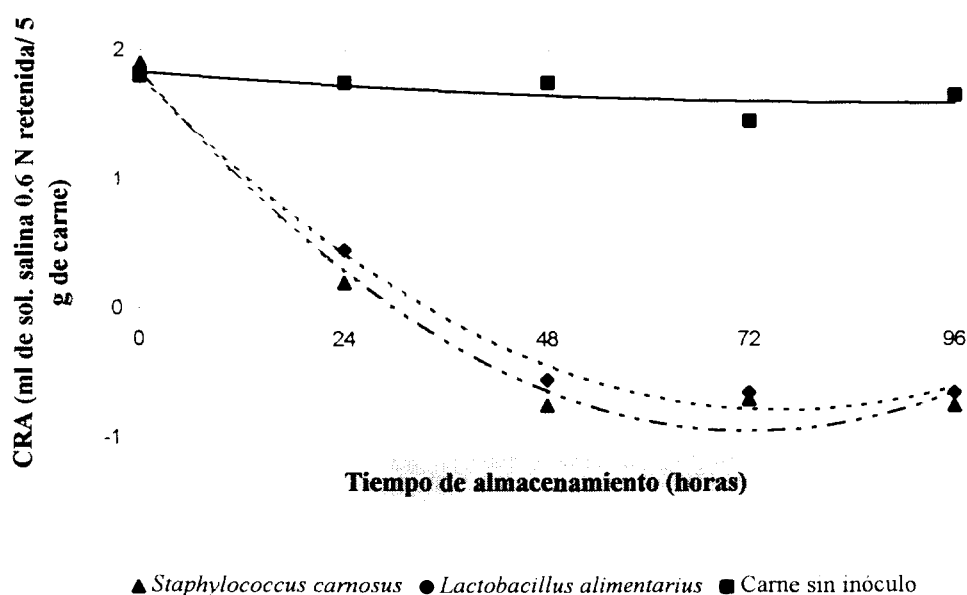


Fig. 9 Cambios en la capacidad de retención de agua (CRA) en la carne de cerdo almacenada a 19°C*.

* Cada punto es el promedio de dos mediciones y las desviaciones estándar se encuentran en un rango de 0.070-0.353.

6.1.4 Color

Una de las propiedades más importantes en la calidad de la carne es el color, el cual es fundamental en la aceptación del producto por parte de los consumidores. Como se mencionó en la sección 4.3.3 el color de la carne depende del estado de oxidación de la molécula de hierro de la mioglobina.

En carne empacada al vacío, donde se tienen pequeñas cantidades de oxígeno (Waites, 1988) además de un ambiente reductor generado por la disminución del pH de la carne, favorece la formación de la metamioglobina que proporciona un color marrón (Lawrie, 1985). También influye en la coloración de la carne la condición PSE (pálido, suave y exudativo) debido a la poca hidratación que ocasiona la textura suave y apariencia pálida (Gill y Penney, 1986).

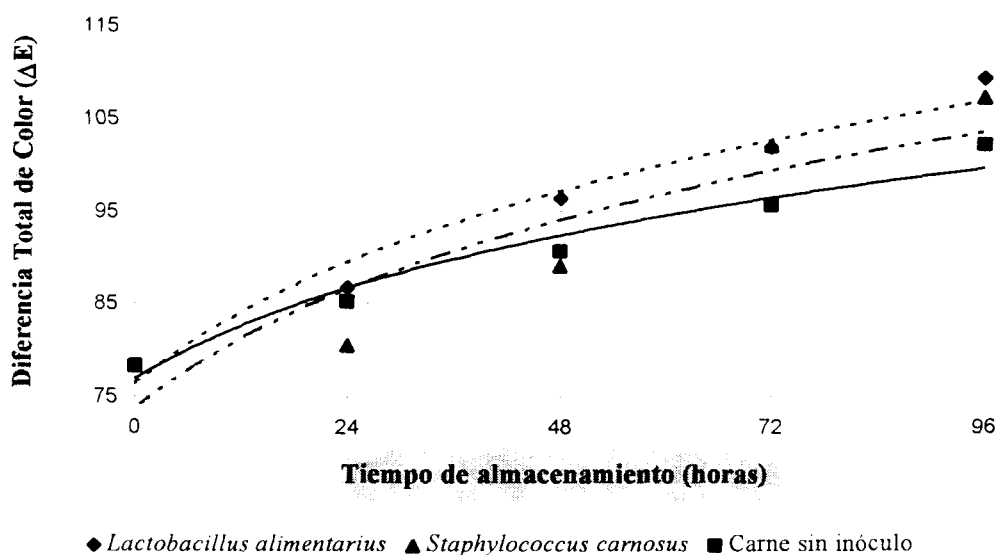


Fig. 10 Cambios en ΔE de la carne de cerdo almacenada a 4°C*.

* Cada punto es el promedio de tres mediciones y las desviaciones estándar se encuentran en un rango de 1.053-4.574.

El color se reporta en esta tesis como Diferencia Total de Color (sección 5.2.4). A 4°C no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.073$) entre la muestra sin inóculo y la carne fermentada (Tabla 12).

A la temperatura de almacenamiento de 19°C se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) para la carne sin inóculo y la muestras fermentadas. Por una comparación de medias de Duncan no se encontraron diferencias significativas con $\alpha = 0.05$ entre el color de la carne inoculada con *Staphylococcus carnosus* y con *Lactobacillus alimentarius*, sin embargo es el primer inóculo el que produce un mayor cambio en el color de la carne (Fig. 11).

En la Tabla 20 se presentan las ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) para el ΔE contra tiempo.

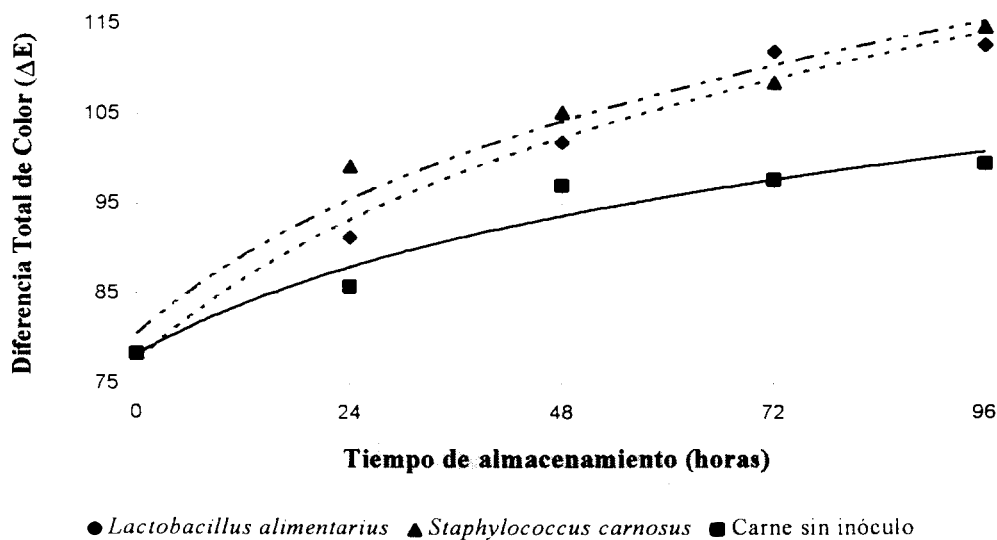


Fig. 11 Cambios en ΔE de la carne de cerdo almacenada a 19°C*.

* Cada punto es el promedio de tres mediciones y las desviaciones estándar se encuentran en un rango de 1.053-4.574.

Como se esperaba el mayor cambio en el color se produjo en las muestras en las que se reduce significativamente el pH (sección 4.3.3). También es posible que influya la exudación que se produce en carne fermentada, por efecto de la reducción de la CRA (sección 6.1.3) lo que produce apariencia pálida (Gill y Newton, 1982).

6.1.5 Textura

Por pruebas de compresión no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.7388$) para la carne sin inóculo y la carne fermentada a la temperatura de almacenamiento de 4°C, siendo la tendencia de cambio en la fuerza necesaria para comprimir 50% las muestras muy similar entre los tratamiento como se observa en la Fig. 12.

En la Tabla 21 se presentan las ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) para la fuerza contra tiempo.

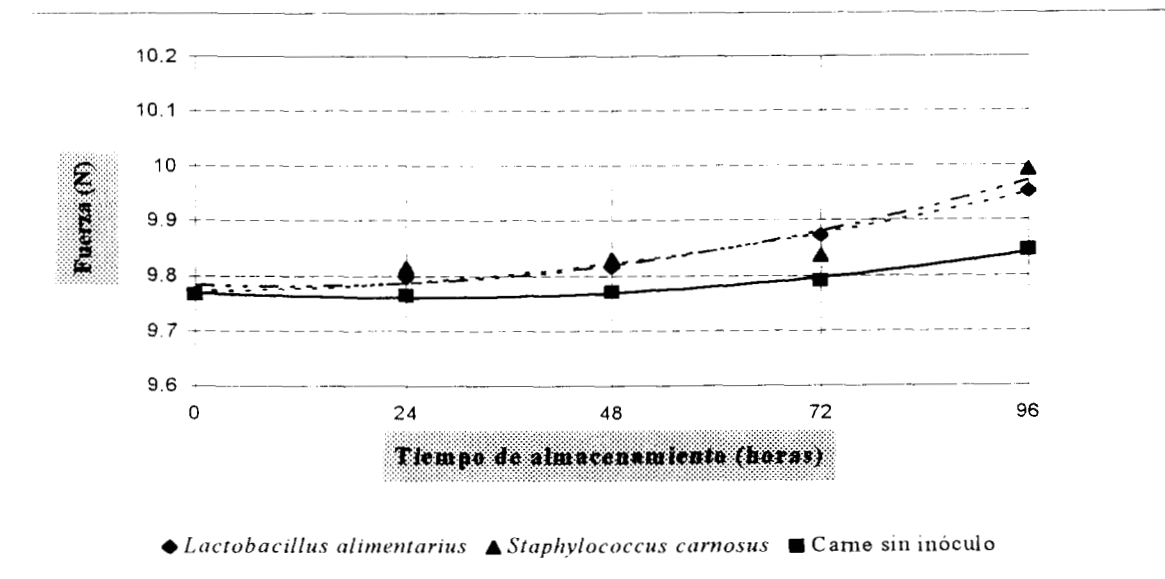


Fig. 12 Fuerza necesaria para una compresión al 50% en carne de cerdo almacenada a 4°C*.

* Cada punto es el promedio de tres mediciones y las desviaciones estándar se encuentran en un rango de 0.0353-0.370.

A 19°C se encontraron diferencias significativas ($P < 0.010$) entre la muestra sin inóculo y la carne fermentada (Tabla 13). La comparación de medias con la prueba de Duncan con una $\alpha = 0.05$, no mostró diferencias significativas de dureza entre la carne inóculada con *Staphylococcus carnosus* y con *Lactobacillus alimentarius*, siendo el primero el que mayor efecto tiene sobre la dureza de la carne como se observa en la Fig. 13. Esta diferencia puede explicarse debido a la reducción en la CRA (sección 6.1.3) que hace que la carne tienda a ser más seca y por consiguiente más dura.

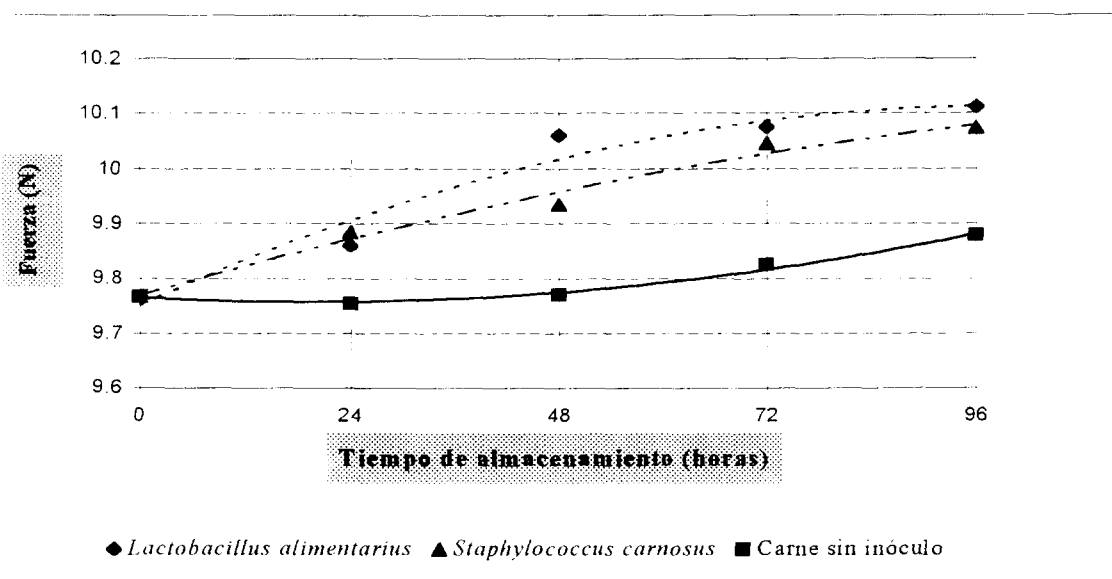


Fig. 13. Fuerza necesaria para una compresión al 50% en carne de cerdo almacenada a 19°C*.

* Cada punto es el promedio de tres mediciones y las desviaciones estándar se encuentran en un rango de 0.0353-0.370.

6.2 EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA

6.2.1 Crecimiento de bacterias lácticas

Se realizó una cuantificación de la población de bacterias láctica. Es importante hacer notar que esta detectó una cuenta total de bacterias lácticas, tanto homofermentativas como heterofermentativas.

Fue necesario establecer las condiciones de activación de los inóculos de *Staphylococcus carnosus* y *Lactobacillus alimentarius* para poder inocular la carne. Estas condiciones se mencionaron en la sección 5.1.

Como se observa en la Fig. 14 y 15, la temperatura de almacenamiento tuvo un efecto significativo ($P < 0.0001$) (Tabla 14) sobre el crecimiento de bacterias lácticas, siendo mayor el crecimiento a temperatura de almacenamiento de 19°C en comparación con la temperatura de 4°C. A este respecto McMullen y Stiles (1996) mencionan la dificultad que se tiene al seleccionar bacterias lácticas que presenten una tasa alta de crecimiento en temperaturas de refrigeración y que se adapten a sustratos cárnicos. En la Tabla 22 se presentan las ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) entre la población de bacterias lácticas contra tiempo.

En la carne almacenada a 4°C el crecimiento de bacterias lácticas se mantuvo constante hasta las 24 horas (Fig. 14) posteriormente se tuvo una tendencia a disminuir. Este comportamiento pudo deberse a que los inóculos de *Staphylococcus carnosus* y *Lactobacillus alimentarius* no se adaptan durante las 96 horas de almacenamiento a la temperatura de refrigeración por lo que la población disminuyó. Sin embargo como se mencionó anteriormente la reducción del pH fue significativa (sección 6.1.1) para la carne fermentada, lo que redujo la cuenta de microorganismos que provocan su descomposición.

A 19°C se observó un crecimiento constante de las bacterias lácticas hasta las 48 horas de almacenamiento (Fig. 15). Mientras que a partir de las 72 horas se tuvo una reducción en la

población. Este comportamiento puede explicarse debido a la disponibilidad de carbohidratos ya que una vez terminados estos, posiblemente se activa el mecanismo proteolítico a partir del cual se utilizan las proteínas de la carne (Ahn y Stiles, 1990). Otra posibilidad que reportan MacDonald y col. (1990) se debe a la reducción del pH que puede limitar el crecimiento de las bacterias lácticas.

Como era de esperarse, estadísticamente se encontró una diferencia significativa ($P < 0.010$) de las poblaciones de bacterias lácticas de la carne sin inóculo y las muestras fermentadas, Por comparación de medias de Duncan con una $\alpha = 0.05$ no se encontraron diferencias significativas entre las muestras, siendo la carne inóculada con *Staphylococcus carnosus* la que presentó mayor crecimiento de bacterias lácticas.

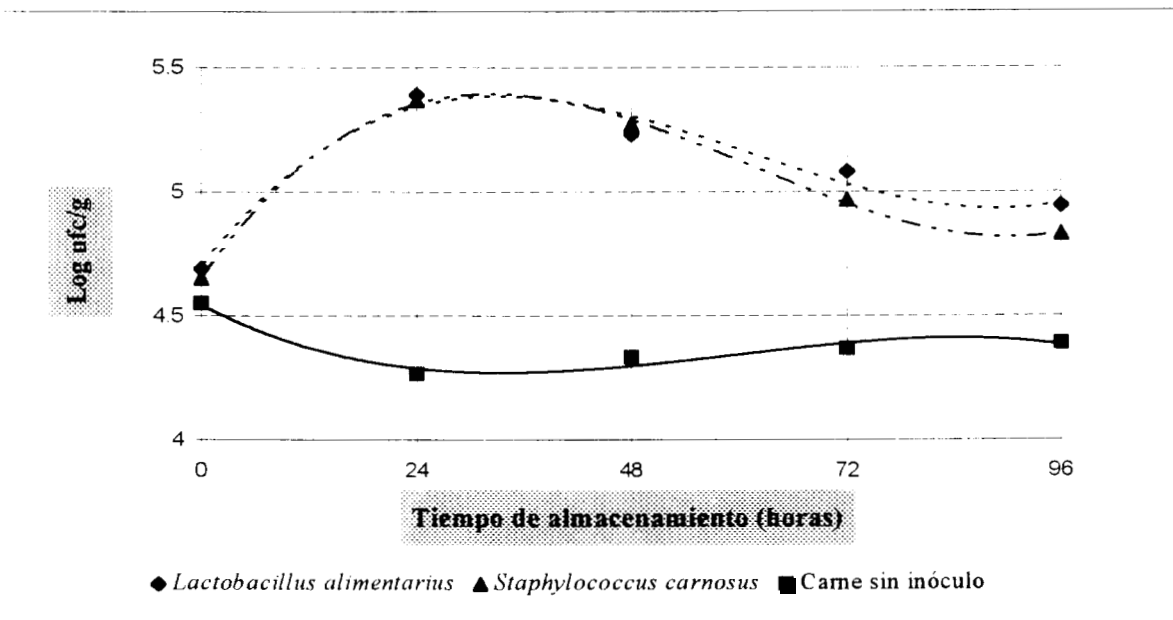


Fig. 14 Población de bacterias lácticas a 4°C*.

* Cada punto es el promedio de dos mediciones y las desviaciones estándar se encuentran en un rango de 0.036-0.794.

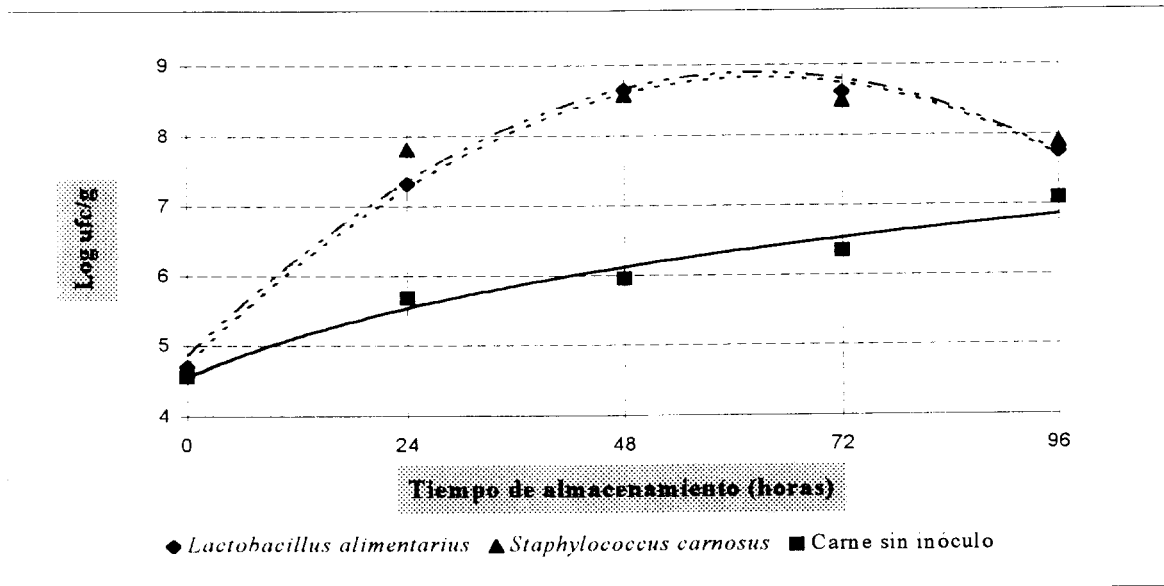


Fig. 15 Población de bacterias lácticas a 19°C*.

* Cada punto es el promedio de dos mediciones y las desviaciones estándar se encuentran en un rango de 0.030-0.794.

6.2.1 Crecimiento de *Enterobacteriaceae*

En el proceso de descomposición de la carne almacenada bajo condiciones aerobias las bacterias del género *Pseudomonas sp.* llegan a constituir más del 90% de la flora de carne refrigerada (Gill y Penny, 1986). Sin embargo en carne envasada al vacío su potencial de descomposición es bajo (Guerrero y Taylor, 1994) y predominan en la descomposición bacterias del género *Enterobacteriaceae*.

Se ha reportado que para inhibir el crecimiento de las enterobacterias se requieren pH bajos (Gill y Penny, 1986) por lo que se recomienda la sustitución de la flora nativa de la carne por una flora de bacterias lácticas. Para cuantificar el crecimiento de enterobacterias fue necesario modificar el tiempo de incubación de las muestras. Inicialmente se incubaron 24 horas a 37°C como se recomienda en el Manual Merck (1990). Sin embargo con las

muestras almacenadas a 4°C y la carne fermentada y almacenada a 19°C fue necesario incubar durante 48 horas (sección 5.3.1 y 5.3.2) para obtener crecimiento.

Como se observa en la Fig. 16 a 4°C no se presentó una reducción en el crecimiento de las enterobacterias hasta las 72 horas de almacenamiento. Esto puede explicarse en función de la reducción del pH que disminuye a partir de las 48 horas de fermentación (Fig. 4), sin embargo no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.129$) entre la carne sin inóculo y la carne fermentada (Tabla 15). En la Tabla 23 se presentan las ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) entre la población de enterobacterias contra el tiempo.

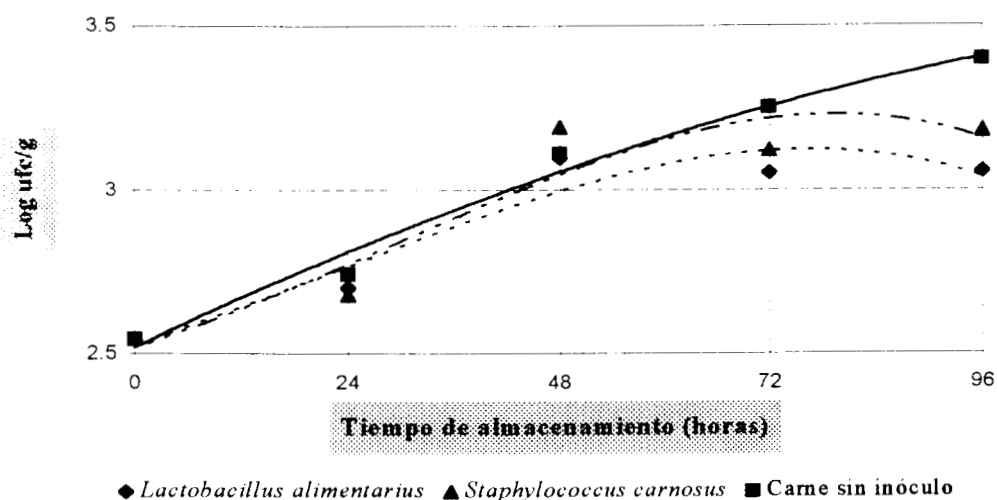


Fig. 16 Población de *Enterobacteriaceae* a 4°C*.

* Cada punto es el promedio de dos mediciones y las desviaciones estándar se encuentran en un rango de 0.032-0.281.

Cabe mencionar que el efecto conservador de la fermentación láctica se debe a la reducción en el pH de la carne, al ácido láctico en su forma no disociada y a la competencia por el sustrato disponible entre las bacterias lácticas y la demás flora microbiana de la carne. En este sentido se tiene una polémica sobre la importancia de cada uno de estos aspectos (Smulders y col., 1986).

Se puede mencionar que tal vez la reducción en el pH y la competencia por el sustrato sean las que estén ejerciendo el efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las *Enterobacteriaceae* debido a que la cantidad de ácido láctico se reduce conforme transcurre la fermentación (sección 6.2.1).

A 19°C se reduce el crecimiento de *Enterobacteriaceae* (Fig. 17) a partir de las 24 horas en 1.5-2.5 ciclos logarítmicos, esto significó una reducción aproximada del 20%. Con respecto al inóculo se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) entre la carne sin inóculo y la carne fermentada con *Lactobacillus alimentarius* y con *Staphylococcus carnosus*, siendo éste último inóculo el más eficiente en la reducción de las poblaciones de enterobacterias.

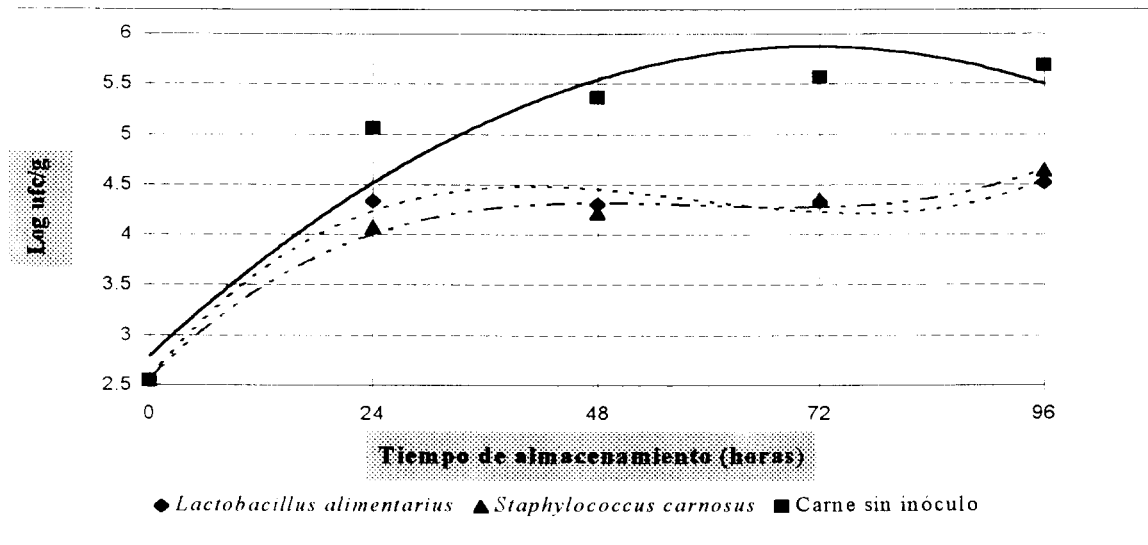


Fig. 17 Población de *Enterobacteriaceae* 19°C*.

* Cada punto es el promedio de dos mediciones y las desviaciones estándar se encuentran en un rango de 0.032-0.281.

6.4 ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA Y LIPOLÍTICA EN CARNE

6.3.1 Degradación de proteínas

Un aspecto importante en la calidad de carne es la degradación proteolítica. Como se mencionó en la sección 4.2.1 existe una polémica en el sentido de determinar si existe actividad proteolítica de las bacterias lácticas sobre las proteínas miofibrilares de la carne. Mientras algunos autores mencionan que si se tiene efecto de las bacterias lácticas sobre las proteínas miofibrilares otros concluyen que no se tiene actividad importante (Toldrá y Etherington, 1988; Klement y col., 1974).

Para determinar la actividad proteolítica se extrajeron las proteínas miofibrilares contráctiles mayores actina y miosina utilizando soluciones salinas de diferentes fuerza iónica (Flores y Bernell, 1984) como se mencionó en la sección 5.4.1. A partir de los marcadores de proteínas conocidas se obtuvo la curva patrón: $y = 5918.36 x - 418605.82$, $R^2 = 0.9527$ donde y es el peso molecular de la proteína en Da y x es el tiempo de retención.

Como se observa en las Fig. 18 y 19 la tendencia para ambas temperaturas fue similar. Se detectó a las 96 horas de almacenamiento la formación de tres péptidos a partir de la cadena de miosina pesada, mientras que no se obtuvo proteólisis evidente sobre la molécula de actina entre la muestra control y las muestras fermentadas.

A 4°C se observó a las 48 horas de almacenamiento los picos correspondientes a la molécula de miosina pesada y actina, con un peso molecular de 205 kDa y 45 kDa respectivamente (Flores y Bernell, 1984). A partir de las 96 horas de almacenamiento se observó la degradación de la cadena de miosina pesada formándose tres péptidos con un peso molecular en un intervalo de 144,800-210,000 Da.

Estos mismos resultados los han reportado Porzio y Pearson (1975) quienes mencionan que puede tratarse de meromiosina pesada, meromiosina ligera y premeromiosina.

Resultados y discusión

Para las muestras almacenadas a 19°C se observó el mismo comportamiento, es decir a las 96 horas de almacenamiento no se detecta degradación evidente de actina, mientras que la molécula de miosina pesada presenta la formación de tres péptidos con un intervalo de peso molecular de 173,800-233,600 Da.

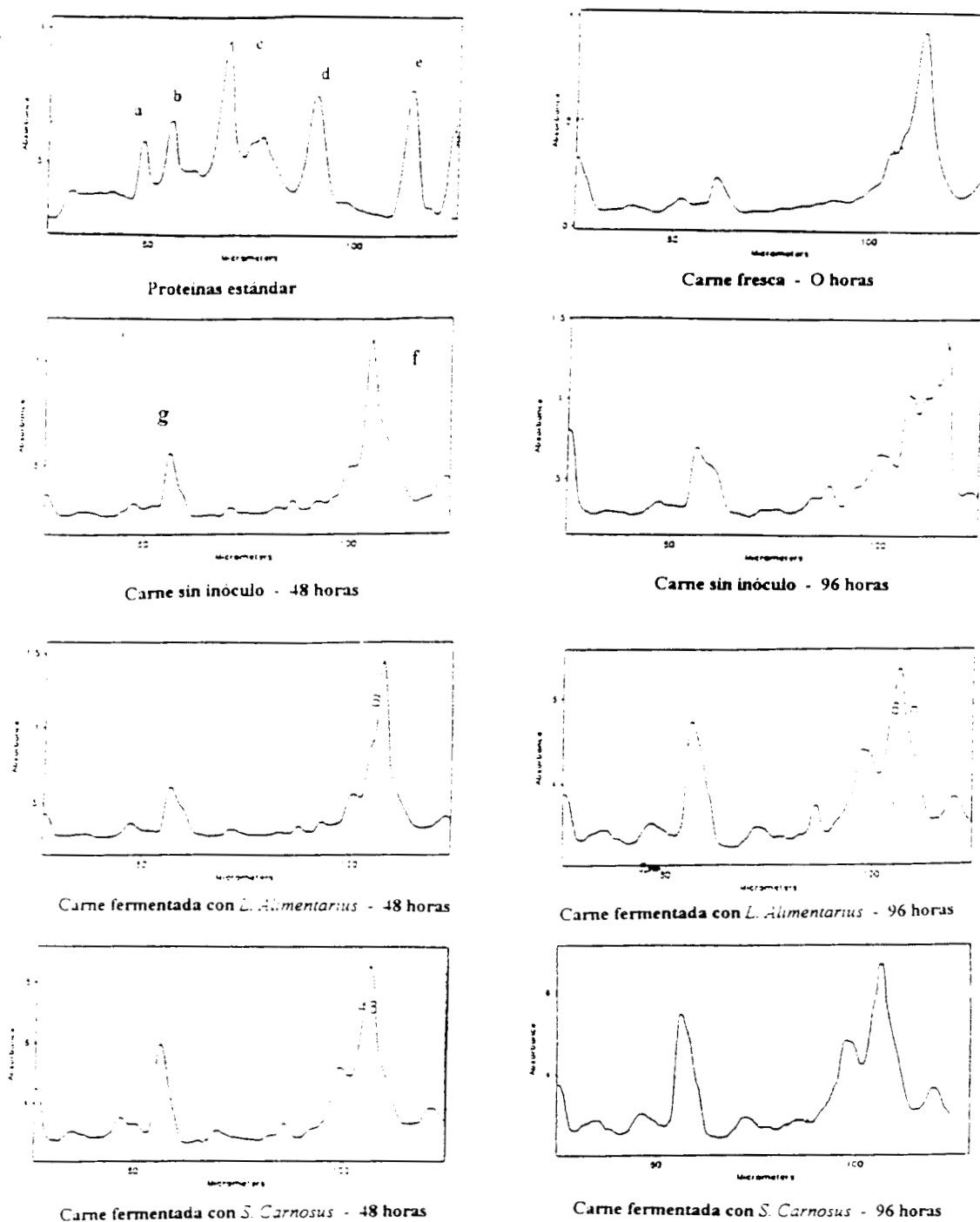


Fig. 18 Perfil electroforetico de las proteínas contráctiles mayores miosina (f) y actina (g) en carne de cerdo almacenada a 4°C. Proteínas estándares, a: anhidrasa carbónica, b: albúmina de huevo, c: albúmina bovina, d: β -galactosidasa, e: miosina.

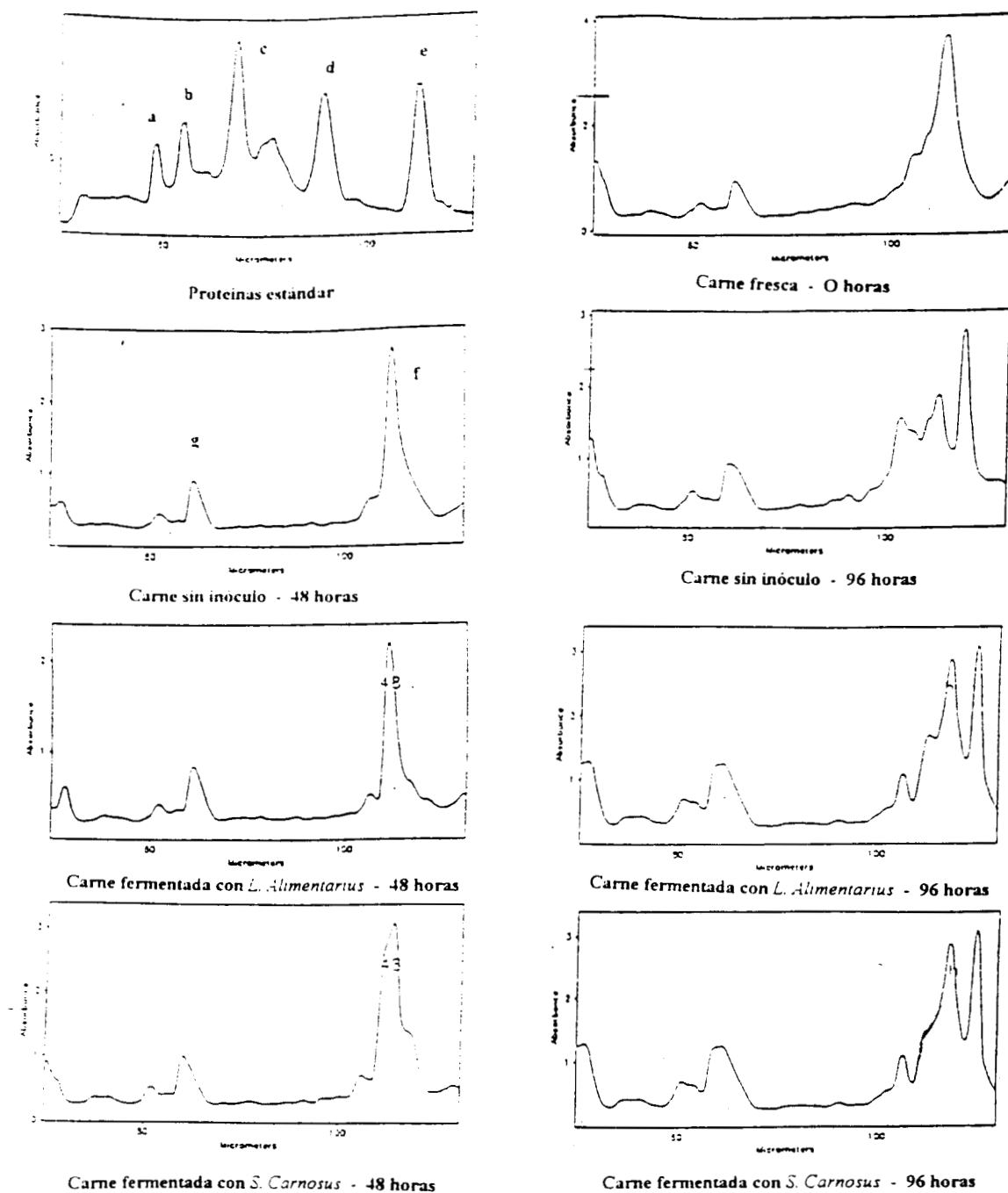


Fig. 19. Perfil electroforético de las proteínas contráctiles mayores miosina (f) y actina (g) en carne de cerdo almacenada a 19°C. Proteínas estándares, a: anhidrasa carbónica, b: albúmina de huevo, c: albúmina bovina, d: β -galactosidasa, e: miosina.

6.3.1 Análisis de ácidos grasos de cadena larga

Algunos autores señalan que la formación ácidos grasos libres es el resultado de la hidrólisis de fosfolípidos, aunque también se sabe que debido a la actividad lipolítica se producen ácidos grasos libres a partir de triglicéridos (Montilva y col., 1993). La formación de ácidos grasos libres hace que la carne sea más susceptible a la oxidación, en el caso de carne fresca es una característica indeseable mientras que en productos cárnicos fermentados ocasionan reacciones posteriores que dan origen a compuestos volátiles proporcionando el sabor característico a las carnes fermentadas (Montilva y col., 1993).

Para evaluar la actividad lipolítica que presenta la carne fermentada se realizó un seguimiento por cromatografía de gases de la formación de ácidos grasos conforme transcurre el tiempo de fermentación. En las Tablas 8 y 9 se muestra la concentración de ácidos grasos de cadena larga durante el almacenamiento. La tendencia en general fue aumentar la cantidad de ácidos grasos libres a las dos temperaturas estudiadas. A 19°C se obtuvieron valores mayores de concentraciones de ácidos grasos libres en comparación con 4°C.

Se puede mencionar que los ácidos mirístico, esteárico, linoleico y palmitico son los que se generan en la carne fermentada con *Staphylococcus carnosus* alcanzándose a las 96 horas de almacenamiento valores de 158.2, 157, 102.5, 71.6 mg/100 g de carne y la carne fermentada con *Lactobacillus alimentarius* valores de 131.4, 171.2, 160.4 y 104.6 mg/g de carne respectivamente, para la temperatura de 4°C, mientras que en la carne sin inóculo se obtuvieron valores de 120.2, 97.8, 79.6 y 97.8 mg/g de carne respectivamente.

Esta misma tendencia se observó en la carne almacenada a 19°C se obtuvo para carne fermentada con *Lactobacillus alimentarius* valores de 345.28, 170.4 y 345.2, 170.4, 835.6 y 591.2 mg/ 100 g para el ácido mirístico, esteárico, linoléico y palmitico respectivamente a las 96 horas de almacenamiento. Para la carne fermentada con *Staphylococcus carnosus* se obtuvieron valores de 205.5, 246.0, 508.6 y 312.6 mg/ 100 g respectivamente. Con

respecto a la temperatura en carne sin inóculo, se obtuvieron valores de 197.0, 170.4, 288.42 y 170.4 mg/ 100 g de carne respectivamente.

Estos resultados concuerdan lo reportado por Montilva y col., (1993) en el sentido de que se generan cantidades mayores de ácidos mirístico, linoleico u oleico en carne fermentada.

Cabe destacar que al comparar los diferentes tratamientos, la carne fermentada con *Lactobacillus alimentarius* presentó la mayor generación de ácidos grasos libres.

Tabla 8 Concentración de los ácidos grasos de cadena larga en carne de cerdo almacenada a temperatura de 4°C.

Tratamiento	Tiempo (h)	Concentración de los ácidos grasos libres (mg/100 g de carne)					
		Mirístico	Palmitico	Estearico	Oleico	Linoleico	Linolénico
Carne fermentada <i>L. alimentarius</i>	0	25.3	37.4	29.2	76.4	57.8	40.8
	48	62.4	45.6	77.2	52.62	95.3	33.1
	96	131.4	104.6	171.2	92.62	160.4	75.4
Carne fermentada <i>S. carnosus</i>	0	25.3	37.4	29.2	76.4	57.8	40.8
	48	31.8	39.0	85.0	39.8	85.0	29.4
	96	158.2	71.6	157.0	65.8	102.5	65.1
Carne sin inóculo	0	25.3	37.4	29.2	76.4	57.8	40.8
	48	40.2	47.4	70.8	23.2	155.6	50.2
	96	120.2	80.8	97.8	78.88	79.6	65.1

Tabla 9 Concentración de los ácidos grasos de cadena larga en carne de cerdo almacenada a temperatura de 19°C.

Tratamiento	Tiempo (h)	Concentración de los ácidos grasos libres (mg/100 g de carne)					
		Mirístico	Palmítico	Estearico	Oleico	Linoleico	Linolénico
Carne fermentada <i>L. alimentarius</i>	0	25.3	37.4	29.2	76.4	57.8	40.8
	48	157.8	126.88	112.6	151.5	175.8	754.0
	96	345.28	591.2	170.4	751.0	397.0	835.6
Carne fermentada <i>S. carnosus</i>	0	25.3	37.4	29.2	76.4	57.8	40.8
	48	97.4	117.7	84.6	170.4	197.4	397.0
	96	205.5	312.6	246.0	370.4	305.2	508.6
Carne sin inóculo	0	25.3	37.4	29.2	76.4	57.8	40.8
	48	78.88	71.2	112.6	91.2	157.8	225.4
	96	197.0	197.0	170.4	130.2	192.2	288.42

6.4 Análisis de formación de ácido láctico y acético

Debido a que durante la cuantificación de la acidez total titulable (ATT) se obtuvo una reducción en el porcentaje de ácido láctico (sección 6.2.1) se evaluó la concentración de ácidos láctico y acético por cromatografía de gases. La Tabla 25 muestra la concentración de ácidos láctico y acético. En las figuras 20 y 21 se observa la tendencia a disminuir la cantidad de ácido láctico conforme transcurre el tiempo de fermentación. Estos mismos resultados los reportan Borch y Agerhem, (1992) y Nychas y Arkoudelos, (1990). Refieren estos autores una reducción en la concentración de ácido láctico acompañado de un incremento en la concentración de ácido acético. A este respecto mencionan varias posibilidades que pueden provocar este posible cambio en el patrón de fermentación en la carne. La disponibilidad de sustrato, en este caso la glucosa, la concentración de oxígeno, la concentración de lactato deshidrogenasa, NADH peroxidasa, lactato oxidasa o piruvato oxidasa son factores que pueden influenciar la transformación de lactato o piruvato hacia acetato.

Como se muestra en la Fig. 20 a 4°C se tuvo aumento en la cantidad de ácido láctico hasta las 48 horas de fermentación hasta valores de 2.86 mg/g de carne en la muestra sin inóculo y 4.11 y 4.25 mg/g de carne para la muestra fermentada con *Lactobacillus alimentarius* y *Staphylococcus carnosus* respectivamente. A las 96 horas de almacenamiento se detectó una reducción en la concentración en 1.98 mg/g de carne para la muestra sin inóculo y 2.78 y 2.88 mg/g de carne para la carne fermentada con *Lactobacillus alimentarius* y *Staphylococcus carnosus* respectivamente.

A 19°C se obtuvo una mayor producción de ácido láctico presentándose también un incremento de la concentración de ácido láctico al tiempo de 48 horas en 3.44 mg/g de carne para la muestra sin inóculo y 5.93 y 6.24 mg/g de carne para la carne fermentada con *Lactobacillus alimentarius* y *Staphylococcus carnosus*, respectivamente. Posteriormente

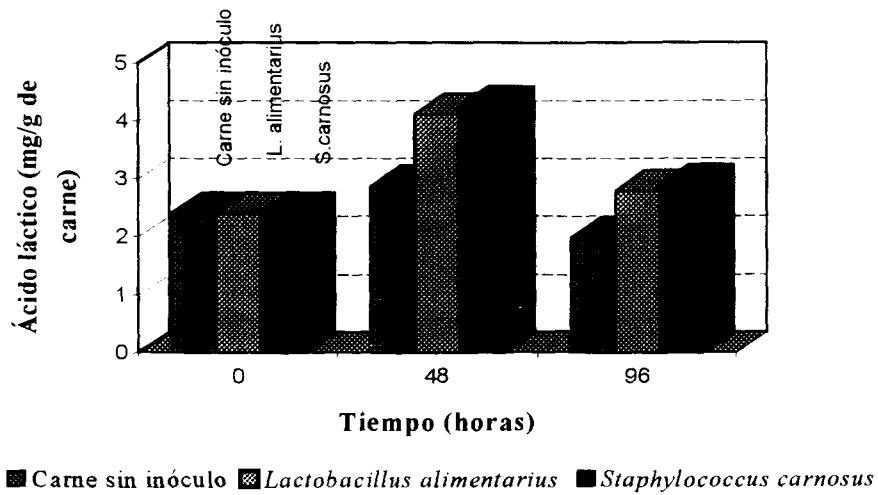


Fig. 20 Perfil de formación de ácido láctico a 4°C.

a las 96 horas de almacenamiento se obtuvo una reducción en la concentración de ácido láctico a un valor de 3.10 mg/g de carne para la carne sin inóculo. Con respecto a la carne fermentada con *Lactobacillus alimentarius* se obtuvo una reducción en la concentración de ácido láctico a 5.12 mg/g de carne y de la carne fermentada con *Staphylococcus carnosus* se obtuvo una reducción de 4.85 mg/g de carne.

Es importante mencionar que para ambas temperaturas la cepa que produjo mayor concentración de ácido láctico fue la de *Staphylococcus carnosus* y por lo tanto fue la más eficiente para los fines de conservación de la carne, ya que se busca tener una alta tasa de producción de ácido láctico, para de esta forma inhibir lo más rápido posible el crecimiento de microorganismos que descomponen la carne (Guerrero y Taylor, 1994).

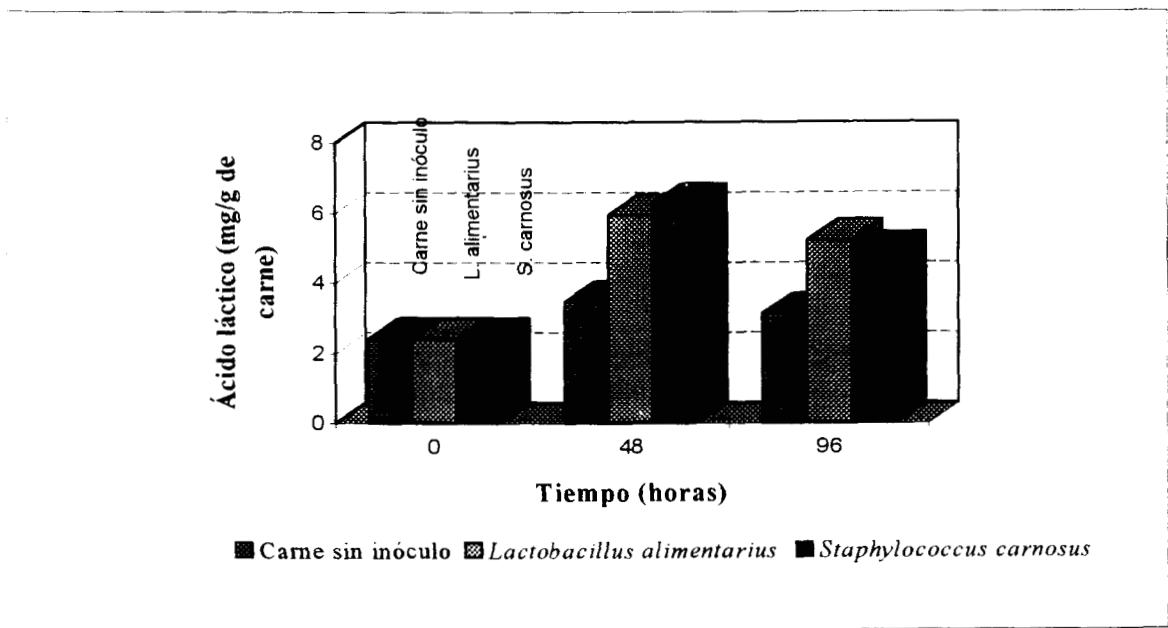


Fig. 21 Perfil de formación de ácido láctico a 19°C.

Como se observa en la Fig. 22 y 23 la tendencia en la concentración de ácido acético fue aumentar conforme transcurre el tiempo de fermentación, lo que concuerda con lo obtenido por autores como Borch y Agerhem (1992) y Nychas y Arkoudelos (1990).

Con respecto a la temperatura de almacenamiento a 4°C se observó un incremento constante en la concentración de ácido acético hasta valores de 2.17 mg/g de carne para la muestra sin inóculo y de 2.51 y 2.44 mg/g de carne para la muestras fermentadas con *Lactobacillus alimentarius* y *Staphylococcus carnosus*, respectivamente. Estos resultados permitirían explicar la tendencia de reducción de pH que se observa en la Fig. 4. Es decir a partir de las 72 horas se observó una tendencia constante a la reducción de pH, lo que puede deberse a que aún cuando la concentración de ácido láctico disminuye la cantidad de ácido acético se incrementa, lo que puede provocar la disminución global del pH.

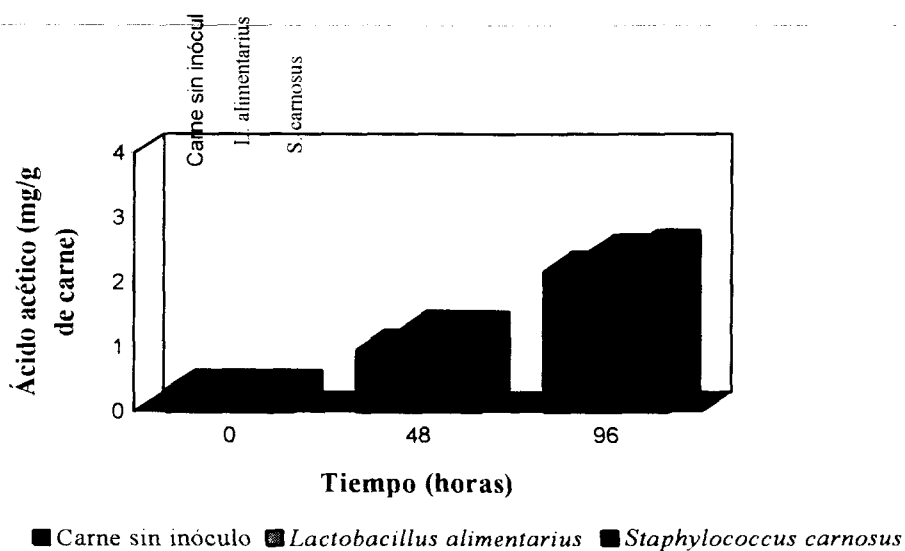


Fig. 22 Perfil de formación de ácido acético a 4°C.

A 19°C se observó el mismo aumento en la cantidad de ácido acético, a las 48 de almacenamiento se produjeron 1.53 mg/g de carne para la muestra sin inóculo y de 1.49 y 1.59 mg/g de carne para la muestra fermentada con *Lactobacillus alimentarius* y *Staphylococcus carnosus*, respectivamente. A las 96 horas de fermentación se obtuvo una concentración de ácido acético de 2.67 mg/g de carne control y de 2.9 y 3.1 mg/g de carne para las muestras fermentadas con *Lactobacillus alimentarius* y *Staphylococcus carnosus*, respectivamente.

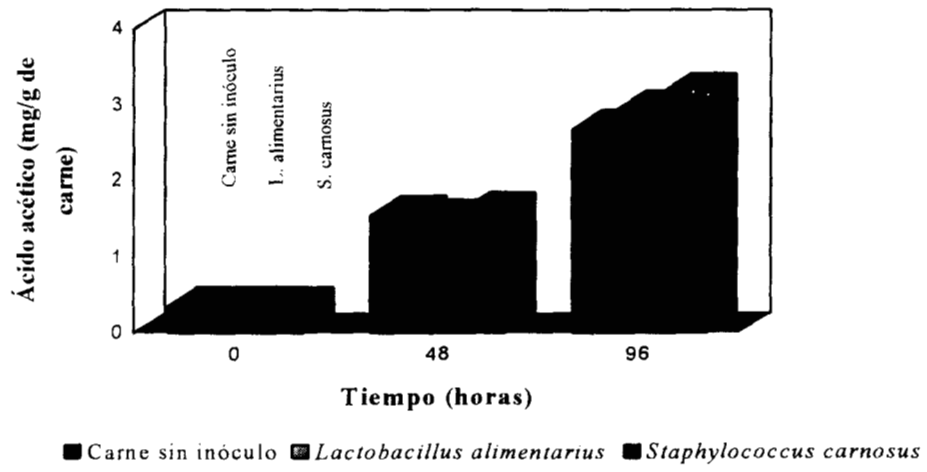


Fig. 23 Perfil de formación de ácido acético a 19°C.

**Todos los triunfos nacen cuando
nos atrevemos a comenzar.**

E. Ware

7. CONCLUSIONES

*Con *Staphylococcus carnosus* se obtuvo el más alto incremento de acidez total titulable (ATT) y reducción de pH en ambas temperaturas probadas debido a la actividad metabólica de esta bacterias láctica que produjo concentraciones mayores de ácido láctico.

*El color presenta un cambio significativo ($P < 0.0001$) en las muestras de carne fermentada con *Staphylococcus carnosus* y *Lactobacillus alimentarius* para la carne almacenada a 19°C, lo cual no se obtuvo en la carne almacenada a temperatura de 4°C.

*Los análisis de la prueba de compresión no mostraron un cambio significativo ($P > 0.73$) para la carne almacenada a 4°C, mientras que la carne almacenada a 19°C si hubo un efecto significativo ($P < 0.010$) con respecto a la carne no inoculada, siendo la carne fermentada con *Staphylococcus carnosus* la que provocó mayor incremento en la dureza, debido posiblemente a la reducción en la capacidad de retención de agua que produce una carne más seca y más dura.

* La capacidad de retención de agua disminuyó significativamente ($P < 0.0001$) en las muestras de carne fermentadas y almacenadas 19°C. Este comportamiento no se presentó en la carne almacenda a temperatura de 4°C. Esto puede ser explicado debido a que la CRA depende del pH y en la carne fermentada y almacenda a 19°C se produjo una mayor reducción del pH que provocó a su vez una reducción significativa de la CRA.

* Se encontró una reducción significativa ($P < 0.0001$) en la cuenta de *Enterobacteriaceae* en la carne almacenada a 19°C entre la muestra fermentada y el control, siendo el inóculo de *Staphylococcus carnosus* más eficiente en tal reducción de las poblaciones de *Enterobacteriaceae* en valores de 1.5-2.5 ciclos logaritmicos. A la temperatura de 4°C se encontró reducción en la cuenta de de *Enterobacteriaceae* a partir de las 72 horas de almacenamiento.

* Con respecto a la cuenta de bacterias lácticas se encontró efecto significativo ($P < 0.0001$) de la temperatura de almacenamiento, siendo mayor el crecimiento a la temperatura de 19°C en comparación con la temperatura de 4°C. A 19°C se obtuvo crecimiento constante hasta las 48 horas, mientras que a partir de las 72 horas las poblaciones disminuyen. A 4°C se obtuvo crecimiento constante hasta las 24 horas de almacenamiento y posteriormente se observó reducción en las cuentas de bacterias lácticas. Por la prueba de Duncan no se encontraron diferencias en el crecimiento de bacterias lácticas entre las muestras fermentadas con *Staphylococcus carnosus* y *Lactobacillus alimentarius* para ambas temperaturas.

* Con respecto a la actividad proteolítica los resultados obtenidos por electroforesis de poliacrilamida (SDS) muestran que las cepas utilizadas de *Staphylococcus carnosus* y *Lactobacillus alimentarius* no presentaron actividad proteolítica evidente sobre la molécula de actina, mientras que en miosina pesada se generaron tres péptidos, que pueden tratarse de meromiosina pesada, meromiosina ligera y premeromiosina con un rango de peso molecular de 145,000-210,000 Da.

* La producción de ácido láctico disminuye conforme transcurre el tiempo de fermentación mientras que la concentración de ácido acético se incrementa, lo que sugiere que el patrón de fermentación posiblemente cambie de una fermentación homoláctica hacia una fermentación heteroláctica. Es importante mencionar que en la población nativa de la carne también pueden encontrarse bacterias lácticas heterofermentativas, que pueden predominar al final del tiempo de almacenamiento e influir en el patrón de fermentación.

* Se encontró generación de ácidos grasos libres conforme transcurre el tiempo de fermentación, produciéndose principalmente ácidos mirístico, esteárico y linoléico. *Lactobacillus alimentarius* presentó la mayor generación de ácidos grasos libres.

Finalmente es importante mencionar que con la aplicación de la fermentación láctica como método de bioconservación se ven afectadas propiedades funcionales como el color, textura, y la capacidad de retención de agua, sin embargo se mejora la calidad sanitaria de la carne al

Conclusiones

reducirse las cuentas de microorganismos indicadores de descomposición como las enterobacterias. Por lo anterior la carne sometida a fermentación probablemente no sea totalmente aceptada por los consumidores debido a que no presente características sensoriales agradables, sin embargo puede ser utilizada para la elaboración de productos cárnicos procesados, donde la calidad microbiológica es uno de los factores más importantes, queda latente la posibilidad de estudios de reducción de las concentraciones de conservadores químicos en carnes, sustituyéndolos por métodos de bioconservación.

8. BIBLIOGRAFIA

- Acuff, G.R.**, Vanderzant, C., Savell, J.W., Jones, D.K., Griffin, D.B. y Ehlers, J.W. 1987. Effect of acid decontamination of beef supprime cuts on the microbiological and sensory characteristics of steaks. *Meat science*, **19**:217-226
- Adams, M.R.** y Hall, C.J. 1988. Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and other mixtures. *International Journal of Food Science and Technology*, **23**:287-293
- Ahn, C.** y Stiles, M.E. 1990. Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged meats. *Journal of Applied Bacteriology*, **69**:302-310
- Alanís, E.** 1997. Acción de proteasas de *Pseudomonas spp.* sobre proteínas contráctiles en un sistema modelo. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, México, D.F.
- Alle, C.E.** y Allen, F. 1981. Some lipid characteristics and interactions in muscle foods. A review. *Food Technology*, **45**: 253-257
- AOAC.** 1980. Official methods of analysis. 13a. Edición. Association of Official Analytical Chemists, Washington.
- Axelsson, L.T.**, Chung, T.C., Dobrogosz, W.J. y Lindgren, S. 1989. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology Health*, **2**:131-136
- Bacus, J.** 1984. Utilization of microorganisms in meat processing. *Research Studies Press*, Elsevier Science Publishers Ltd. pp. 70-80, Londres

- Badui, S.** 1991. Química de los Alimentos, Editorial Alhambra Mexicana, pp. 156-160, México, D.F.
- Baird-Parker, A.C.** 1980. Organic acids. En: *Microbial Ecology of Foods*. J.H. Sikiller, R.P. Elliot, A.C. Baird-Parker, F.L. Bryan, J.H.B. Christian, D.S. Clark, J.C. Olson, Jr. y T.R. Roberts (Eds). Academic Press, pp. 126-135, Nueva York
- Biemuller, G.,** Carpenter, J. y Reynolds, A. 1973. Reduction of bacteria on pork carcasses. *Journal of Food Science*, **38**:261-265
- Bohinski, R.C.** 1987. Bioquímica, Editorial Addison-Wesley Iberoamericana, 3a. edición, pp. 30, 109, 110, México, D.F.
- Borch, E. y** Agerhem, H. 1992. Chemical, microbial and sensory changes during the anaerobic cold storage of beef inoculated with a homofermentative *Lactobacillus sp.* or a *Leuconostoc sp.* *International Journal of Food Microbiology*, **15**:99-108
- Bruno, M.E.C.** y Montville, T.J. 1993. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Enviromental Microbiology*, **59**:3003-3010
- Buckenhusk, H.J.** 1993. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter culture for varios food comodities. *FEMS Microbiology Review*, **12**:253-271
- Buchanan, R.L.** 1985. *Aeromonas hydrophyla* and *Aeromonas sobria* as potential food poisoning species: A review. *Journal Food Safety*, **7**:15-29
- Carballo, B.** y López, T.G. 1991. Manual de Bioquímica y Tecnología de la carne, A. Madrid Vicente Ediciones, pp. 64-65, Madrid
- Collins, M.D.,** Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Fergus, S. y Jones, D. 1987. Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola* and some catalase-negative,

asporogenous, rod-shape bacteria from poultry in a new genus *Carnobacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **37**:310-316

Condon, S. 1987. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Review*, **46**:269-280

Chen, M.T., Ockerman, H.W., Chaill, V.R., Plimpton, R.F. y Parret, N.A. 1981. Solubility of muscle proteins as a result of autolysis. *Journal of Food Science*, **46**:1139-1158

Cheng, Chin-Seng y Parrish, F.C. 1979. Heat-induced changes in myofibrillar proteins of bovine *Longissimus* muscle. *Journal of Food Science*, **44**:1-3

Christie, W. W. 1982. Isolation, separation, identification and structured lipid analysis, 2a. edición, Pergamon Press, pp. 53, Oxford

Daeschel, M. y Ray, B. 1992. Food preservation of microbial origin. CYR Boca Ratón, Press

Dahly, T.A., Midden, W.R. y Hartman, P.E. 1989. Comparison of killing of Gram-negative and Gram positive bacteria by pure single oxygen. *Journal of Applied Bacteriology*, **171**:2188-2194

Dainty, R.H. 1981. Volatile fatty acid detected in vacuum packaged beef during storage at chill temperatures. *Proceedings of the 27th European Meeting on Meat Research Workers*, pp. 668-691, Colorado Springs

Dainty, R.H. y Hibbard, C.M. 1983. Precursors of the major end products of aerobic metabolism of *Brochothrix thermosphacta*. *Journal of Applied Microbiology*, **55**:127-133

- Dainty, R.H.** y Mackey, B.M. 1992. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *Journal of Applied Bacteriology*, **73**:1035-1145
- Dezeure-Wallis, B.** y Vant'Hoof, J. 1980. Effect of lactic acid sprays on beef carcass contamination. *Proceedings of the 24th European Meetings of Meat Research Workers*, pp. 316-318, Colorado Springs
- Drummond, I.W.** y Shama, G. 1982. A rapid gas chromatographic method for the analysis of acidic fermentation products. *Chromatographia*, **15**: 180-183.
- Dubois, G.,** Beaumier, H. y Charbonneau, P. 1979. Inhibition of bacteria isolated from ground meat by *Streptococcaceae* and *Lactobacillaceae*. *Journal of Food Science*, **44**:1649-1652
- Edwards, R.A.,** Hibbard, C.M. y Dainty, R.H. 1987. Volatile compounds produced by meat pseudomonads and related references strains during growth on beef stored in air at chill temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*, **62**:403-412
- Fernandes, C.F.** y Shahani, K.M. 1990. Anticarcinogenic and immunological properties of dietary *Lactobacilli*. *Journal of Food Protection*, **53**:704-710
- Ferreira, V.L:P.,** Fernandes, S.V. y Yotsuyanagi, K. 1994. The colour of chicken and pork meat loaf with added cured bovine blood as evaluated by the Rab, Hunter Lab, y CIE L*a*b* y XYZ. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, **34**:311-322
- Flores, J.** y Bernell, S. 1984. Estructura y propiedades bioquímicas de las proteínas miofibrilares. *Revista Agroquímica y Tecnología de los Alimentos*, **24**:1-5
- Forrest, J.C.** 1979. Fundamentos de la Ciencia de la Carne. Editorial Acribia, pp. 2-4, 64,65, 66, Zaragoza (España)

- García, T.,** Martín, R. Sanz, B. y Hernández, P.E. 1995. Extensión de la vida útil de la carne fresca. I: Envasado en atmósferas modificadas y utilización de bacterias lácticas y bacteriocinas. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, **35**:1-10
- Gibbs, P.A.** 1987. Novel uses for acid lactic fermentation in food preservation. En: *Changing Perspectives in Applied Bacteriology Suppentl.* Gutteridge, C.S. y Norris, J.R. (Eds), pp. 51S-58S
- Gill, C.O.** 1986. The control of microbial spoilage in fresh meat. *Meat and Poultry Microbiology*, Advances in Meat Rsearch, Vol. 2, Pearson, AM y TR Dutson, TR (Eds) pp. 49-88
- Gill, C.O.** y Newton, K.G. 1982. Effect o f lactic acid concentration no growth on meat of Gram-negative psychrotrophs from a meat. *Applied and Enviromental Microbiology*, **43**:284-288
- Gill, C.O.** y Penney, N. 1986. Packaging of chilled red meats for shipment to remote markets. En: *Recent Advances and Developments in the Refrigeration of Meat by Chilling.* pp. 521-525
- Gonzalez, S.N.,** Apella, M.C., Romero, N.C., Nader de Macas, M.E. y Oliver. G. 1993. Inhibition of enteropathogens by *Lactobacilli* strains on fermented milk. *Journal of Food Protection*, **56**:773-776
- Gornall, A.G.,** Bardwill, J. y David, M.M. 1948. Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *Journal of Biological and Chemistry*, 177-182
- Grau, F.H.** 1983 Microbial growth on fat and lean surfaces of vacuum-packaged chilled beef. *Journal of Food Science*, **48**:326-328

- Greer, G.** 1989. Red meats, poultry and fish. En: *Enzymes and psychrotrophs in raw foods*, R.C., MacKellar (Editor), CRC Press, pp. 268-292, Inc. Boca Ratón, Florida
- Guerrero, I.** 1993. Productos cárnicos. Biotecnología alimentaria. García, G.M., Quintero, R.R y López, M.A. (Eds), Editorial Limusa, pp. 225-262, México, D.F.
- Guerrero, I.** y Taylor, A.J. 1994. Meat surface descontamination using lactic acid from chemical and microbial sources. *Lebensmittel-Wissens Chaft und-Technologie* 27:201-209
- Guerrero, I.,** Arteaga, M.R. 1990. Tecnología de Carnes. Elaboración y preservación de productos cárnicos, Editorial Trillas, pp. 41,42 México, D.F.
- Guerrero, I.,** Mendiola, R., Ponce, E. y Prado, A. 1995. Inoculation of lactic acid bacteria on meat substrates as a means of descontamination. *Meat Science*, 40:397-411
- Guilliland, S.E.** 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review*, 87:175-188
- Hamby, P.L.,** Savell, J.W., Acuff, G. R., Vanderzant, C. y Crooz, H.R. 1987 Spray-chilling and carcasses decontamination system using acid lactic and acetics acid. *Meat Science*, 21:1-14
- Haynes. P.R.** 1993. Microbiología e Higiene de los Alimentos, Editorial Acribia, pp 75-81, Zaragoza
- Hillier, A.J.,** y Davidson, B.F. 1991. Bacteriocins as food preservatives. *Food Research Quartely*, 51:60-64
- Hitchener, B.J.,** Egan, A.F. y Rogers, P.J. 1982. Characteristics of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged beef, *Journal of Applied Bacteriology*, 52:31-37

- Holt, J.G.,** Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. y Williams, S.T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Williams & Wilkins, 9a. Edición, pp. 528, 530, 565, 566, Baltimore, E.U.
- Holzapel, W.H.** y Gerber, E.S. 1983. *Lactobacillus divergens* sp. a new heterofermentative *Lactobacillus* species producing L(+) Lactate. *Systematic and Applied Microbiology*, **4**:522-534
- Hood, D.E.** y Mead, G.C. 1993. Modified atmosphere storage of fresh meat and poultry. En: Principles and applications of modified atmosphere packaging of food. Parry, R.T (Eds), *Blackie Academic & Professional*, pp. 269-298 Glasgow
- Hughenoltz, J.** 1993. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review*, **12**:165-178
- Jay, J.M.** 1982. Antimicrobial activity of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology*, **44**:525-527
- Jay, J.M.** 1992. Modern Food Microbiology, Van Nostrand Reinhol, pp. 199-210, Nueva York
- Kandler, D.** 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **49**:209-224
- Klaenhammer, T.R.** 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, **70**:337-349
- Klaenhammer, T.R.** 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, **12**:39-86
- Klement, J.T.,** Cassens, R.G. y Fennema, O.R. 1974. The effect of bacterial fermentation on protein solubility in a sausage model system. *Journal of Food Science*, **39**:833-835

- Konings, W.N.** y Otto, R. 1983. Energy transduction and solute transport in *Streptococci*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **49**:247-257
- Kuang, C.C.** 1992. Fatty Acids in Food and their Health Implications. Marcel Dekker, Inc. E.U., pp. 66-78, Nueva York
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, 227-680
- Lawrie, R.A.** 1985. Meat Science. Pergamon Press, pp. 92-107, Oxford
- Leistner, L.** 1983. Prospect of the preservation and processing of meat. *Proceedings of the 5th World Conference on Animal Production*, pp. 1-2, Tokio
- Lindgren, S.E.**, y Dobrogosz, W.J. 1990. Antagonist activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentation. *FEMS Microbiology Review*, **87**:149-164
- Little, A.C.** 1975. Off on a tangent. *Journal of Food Science*, **40**:410-411
- MacMeekin, T.A.** 1982. Microbial spoilage of meats, En: Developments in Food Microbiology, Vol. I, RK, Robinson (Editor). *Elsevier Applied Science Publishers*, pp. 1-39, Londres
- McDonald, L.C.**, Fleming, H.P. y Hassan, H.M. 1990. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **18**:2120-2124
- McMullen, L.M.** y Stiles, M.E. 1996. Potential for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. *Journal of Food Protection*, Supplement, 64-71

- Mendonca, A.F.**, Molins, R.A., Kraft A.A. y Walker, H.W. 1989. Microbiological, chemical, and physical changes in fresh, vacuum-packaged pork treated with organic acids and salts, *Journal of Food Science*, **54**:18-21
- Michels, P.A.M.**, Michels, J.P.J., Boonstra, J. y Konings, W.N. 1979. Generation of an electrochemical proton gradient in bacteria by the excretion of metabolic end-products. *FEMS Microbiology Review*, **5**:357-364
- Modic, P.**, Bastic, L., Zivarovic, R. y Milosevski, V. 1978. The group of weak organic acids with salt on the prolongation of the shelf-life of ground young beef, *Proceedings of the 24th European Meeting of Meat Research Workers*, pp. 5,11, Colorado Springs
- Montel, M.C.** y Talon, R. 1993. Factors affecting growth and lipase production by meat *Lactobacilli* strains and *Brochotrix thermosphacta*. *Journal of Applied Bacteriology*, **64**:229-240
- Montilva, M.J.**, Toldrá, F., Nieto, P. y Flores, J. 1993. Muscle lipolysis phenomena in the processing of dry-cured ham. *Food Chemistry*, **48**:121-125
- Montilva, M.J.**, Toldrá, F., Nieto, P. y Flores, J. 1993. Subcutaneous adipose tissue lipolysis in the processing of dry-cured ham. *Journal of Food Biochemistry*, **16**:323-335
- Mountney, G.J.** y O'Malley, J. 1965. Acids as poultry meat preservatives. *Poultry science*, **44**:582-586
- Nielsen, J.W.**, Dickson, J.S. y Crouse, J.D. 1990. Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**:2142-2145

- Nychas, G.J.** y Arkoudelos, J.S. 1990. Microbiological and physicochemical changes in extracts from different turkey muscles during the growth of *S. aureus*. *Food Microbiology*, **8**:105-117
- Ogden, S.K.**, Taylor, A.J., Guerrero, I., Escalona, H. y Gallardo, F. 1995. Changes in odour, colour and texture during the storage of acid preserved meat. *Lebensmittel-Wissens (haft und-Technologie*, **28**:521-527
- Ooraikul, B.** y Stiles, M.E. 1991. Review of the development of modified atmospheres packaging, En: Modified Atmosphere Packaging of Foods, Ooraikul y M.E. Stiles (Eds), pp. 1-17, Ellis Horwood Series, Nueva York
- Papon, M.** y Talon, R. 1988. Factors affecting growth and lipase production by meat lactobacilli strains and *Brochothrix thermosphacta*. *Journal of Applied Bacteriology*, **64**:107-115
- Papon, M.** y Talon, R. 1989. Cell location and partial characterization of *Brochothrix thermosphacta* and *Lactobacillus curvatus* lipases. *Journal of Applied Bacteriology*, **66**:235-242
- Parry, R.T.** 1993. Principles and applications of modified atmospheres packaging of food. Blackie Academic and Professional, pp. 1-18 Glasgow
- Pearson, A.M.**, y Young, R.B. 1989. Muscle and Meat Biochemistry, Editorial Academic Press, Inc., pp. 9,10, San Diego, California
- Piard, J.C.** y Desmazeaud, M.J. 1991. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*, **71**:525-541
- Porzio, M.A.**, y Pearson, A.M. 1975. Isolation an extracellular neutral proteinase from *Pseudomona fragi*. *Biochemistry*, **17**:384-390

- Ramírez, J.**, Guerrero, I., Ponce, E. y Prado, A. 1994. Changes in flavor attributes during ripening of fermented sausages. *Journal of Muscle Foods*, **6**:257-269
- Raveendran, J.V.**, Ingham, S.C., McCurdy, A.R. y Jones, G.A. 1993. Anaerobic microbiology of fresh beef packaged under modified atmosphere or vacuum. *Journal of Food Science*, **58**:935-938
- Reddy, S.G.**, y Chen, M.L. 1975. Influence of lactic cultures on the biochemical, bacterial and organoleptic changes in beef, *Journal of Food Science*, **40**:314-318
- Reuter, G.** 1975. Classification problem, ecology and some biochemical activities of lactobacilli of meat products. En: Lactic acid bacteria in Beverages and Foods, Editorial Academic Press, pp. 221-229, London
- Reynolds, A.** y Carpenter, J. 1974. Bacterial properties of acetic and propionic acids on pork carcasses, *Journal of Animal Science*, **38**:515-519
- Robach, M.** 1981. Inhibizione del deterioramento e dei batteri patogeni del pollame fresco e confezionato sottovuoto mediante ácido sórbico e sorabtto dei potassio, *Tecnologie Alimentari*, **9**:42-44
- Roca, M.** y Kalman, I. 1989. Antagonistic effect of some starter culture on *Enterobacteriaceae*. *Meat Science*, **25**:123-132
- Salminen, S.** y Wright, A. 1993. Lactic Acid Bacteria, Marcel Dekker, Inc., pp. 7-8, Nueva York
- Sanz, B.**, Selgas, D., Parejo, J. y Ordoñez, J.A. 1988. Characteristics of meat lactobacilli isolated from dry sausages. *International Journal of Food Microbiology*, **6**:18-19
- SAS, Institute.** 1996. SAS User's Guide. Cary, North Caroline

- Savell, J.W.**, Griffin, D.B., Dill, C.W., Dill, C.W., Acuff, G.R. y Vanderzant, C. 1986. Effect of film oxygen transmission rate on lean colour and microbiological characteristic of vacuum-packaged beef knuckles, *Journal of Food Protection*, **49**:917-919
- Schleifer, K.H.** 1986. Section 12, Gram-positive cocci. En: *Bergey's Manual Systematic Bacteriology*, Vol. 2, P.H.A. Sneath, N.S., Mair, M.E., Sharpe y J.G. Holt (Eds), Williams and Wilkins, Baltimore, London, Los Angeles, Sydney
- Seideman, S.C.**, Cross, H.R., Smith, G.C. y Durland, P.R. 1984. *Journal of Food Quality*, **6**:211-215
- Selgas, M.D.**, Sanz, H. y Ordoñez, J.A. 1988. Selected characteristics of micrococci isolated from Spanish dry fermented sausages. *Food Microbiology*, **5**:188-193
- Sharpe, M.E.** y Pettipher, G.L. 1983. Food spoilage by lactic acid bacteria. En: *Economic Microbiology*, Vol. 8, AH Rose (Editor), Academic Press, pp. 199-223, Nueva York
- Shaw., B.G.** y Harding, C.D. 1984. A numerical taxonomy study of lactic acid bacteria from vacuum-packaged beef, pork, lamb and bacon. *Journal of Applied Bacteriology*, **56**:25-40
- Shay, G.J.**, Egan., A.F., Writgh, M. y Rogers, P.J. 1988. Cysteine metabolism in a isolated of *Lactobacillus sake* plasmid composition and cysteine transport. *FEMS Microbiology Review*, **56**:183-188
- Shirai, M. K.**, Guerrero, I. y Lara, P. 1996. Bacterias lácticas en alimentos fermentados. *Ciencia*, **47**:125-137
- Smulders, F.J.** 1987. Prospectives of decontamination of meat and poultry by organic acid to especial reference to lactic acid. En: Elimination of pathogenic organism from

meat and poultry, Smulders, F.J. (Editor), Elsevier Science Publishers, pp. 319-344, Londres

Smulders, F.J.M. y Woolthius, C.H.J. 1985. Immediate and delayed microbiological effects of lactic acid decontamination of calf-carcasses. Influence of conventional versus hot-boned and vacuum packaged cuts. *Journal of Food Protection*, **48**:838-847

Smulders, F.J.M., Barendsen, P., Van Logtestun, J.G., Mossel, D.A.A. y Van Der Marel, G.M. 1986. Lactic acid: considerations in favor of its acceptance as a meat descontaminant. *Journal of Food Technology*, **21**:419-436

Stiles, M.E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **70**:235-249

Stiles, M.E. y Hastings, J.W. 1991. Scientific principles of controlled/modified atmospheres packaging. En: Modified atmospheres Packaging of Food, Ellis Horwood Ltd Ooraikul, B., Stiles, M.E. (Eds.), pp. 18-25 Chichester

Surve, A.N., Sherikan, A.T., Bhilegaonkar, K.N. y Karkare, U.D. 1991. Preservative effect of combinations of acetic acid with lactic or propionic acid on buffalo meat stored at refrigeration temperatures. *Meat Science*, **29**:309-322

Toldrá, F. y Etherington, D. 1988. Examination of cathepsins B, D, H y L activities in dry-cured-hams. *Meat Science*, **23**:1-10

Tseng, C.P. y Montville, T.J. 1993. Metabolic regulation of end product distribution in *Lactobacilli*: causes and consequences. *Biotechnology Programme*. **9**:113-121

Vogel, R.F., Lohmann, M., Nguyen, M., Weller, A.N. y Hammes, W.P. 1993. Molecular characterization of *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sake* isolated of sauerkraut and their application in sausage fermentations. *Journal of Applied Bacteriology*, **74**:295-300

- Waites, W.M.** 1988. Meat microbiology a reassessment. En: Developments in Meat Science, Volumen 4. Lawrie, R. (Editor) Elsevier Applied Science, pp. 317-333, Londres
- Wardlaw, F.B.,** MacCaskill, L.H. y Acton, J.C. 1973. Effects of postmortem muscle changes on poultry meat loaf properties. *Journal of Food Science*, **38**:421-423
- Woolthuis, C.H.J.,** y Smulders, F.J.M. 1985. Microbial descontamination of calf carcasses by lactic acid sprays. *Journal of Food Protection*, **48**:832-837
- Wooltuis, H.J.,** Mossel, D.A., Van Logtestijn, J.D. y Smulders, F.M. 1984. Microbial decontamination of porcine liver with lactic acid and hot water. *Journal of Food Protection*, **47**:221-226
- Ziauddin, K.S.,** Rao, D.N. y Amla, B.L. 1993. In vitro study on the effect of lactic acid and sodium chloride on spoilage and pathogenic bacteria of meat. *Journal of Food Science and Technology*, **30**:204-207

Tabla 10 Análisis estadístico de pH.

Fuente de variación	P > F	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan)*		
TEMPERATURA Temperatura = 4°C	0.0001	— X		
Inóculo	0.0001	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	6.346	A
		<i>Staphylococcus carnosus</i>	6.042	A
		Sin inóculo	6.110	B
Tiempo (h)	0.0001	0	6.361	B
		24	6.363	A
		48	6.152	B
		72	6.081	B
		96	5.873	C
Temperatura = 19°C Inóculo	0.0001	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	5.329	B
		<i>Staphylococcus carnosus</i>	5.187	B
		Sin inóculo	6.154	A
Tiempo (h)	0.0001	0	6.106	A
		24	5.538	B
		48	5.492	B C
		72	5.368	B C
		96	5.281	C

*Letras iguales no son significativamente diferentes.

Tabla 11 Análisis estadístico de la acidez total titulable (% ácido láctico).

Fuente de variación	P > F	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan)*		
TEMPERATURA	0.0001	—		
Temperatura 4°C		N		
Inóculo	0.7393	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	1.2864	A
		<i>Staphylococcus carnosus</i>	1.3035	A
		Sin inóculo	1.2785	A
Tiempo (h)	0.0001	0	1.1323	C
		24	1.4037	A
		48	1.2928	B
		72	1.3030	B
		96	1.3156	B
Temperatura 19°C				
Inóculo	0.0001	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	1.551	A
		<i>Staphylococcus carnosus</i>	1.6057	A
		Sin inóculo	1.320	B
Tiempo (h)	0.0001	0	1.271	C
		24	1.676	A
		48	1.5147	B
		72	1.5248	B
		96	1.474	B

*Letras iguales no son significativamente diferentes.

Tabla 12 Análisis estadístico de la diferencia total de color (ΔE).

Fuente de variación	P > F	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan)*		
TEMPERATURA	0.0001		—	
Temperatura = 4°C			X	
Inoculo	0.7301	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	94.498	A
		<i>Staphylococcus carnosus</i>	91.438	A
		Sin inoculo	90.368	A
Tiempo (h)	0.0001			
		0	178.387	E
		24	184.167	D
		48	92.012	C
		72	99.805	B
		96	106.137	A
Temperatura = 19°C				
Inoculo	0.0001	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	199.164	A
		<i>Staphylococcus carnosus</i>	1101.202	A
		Sin inoculo	91.681	B
Tiempo (h)	0.0001			
		0	78.387	D
		24	92.120	C
		48	101.352	B
		72	105.961	A
		96	108.924	A

*Letras iguales no son significativamente diferentes.

Tabla 13 Análisis estadístico de la textura (por compresión) (N).

Fuente de variación	P > F	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan)*		
TEMPERATURA	0.0319		—	
Temperatura = 4°C			X	
Inoculo	0.7388	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	9.841	A
		<i>Staphylococcus carnosus</i>	9.848	A
		Sin inóculo	9.810	A
Tiempo (h)	0.1085			
		0	9.767	B
		24	9.813	B A
		48	9.798	B A
		72	9.841	B A
		96	9.945	A
Temperatura = 19°C				
Inoculo	0.010	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	9.973	A
		<i>Staphylococcus carnosus</i>	9.941	A
		Sin inóculo	9.796	B
Tiempo (h)	0.0035			
		0	9.767	B
		24	9.804	B
		48	9.921	B A
		72	9.998	A
		96	10.028	A

*Letras iguales no son significativamente diferentes.

Tabla 14 Análisis estadístico de la población de bacterias lácticas (ufc/g).

Fuente de variación	P > F	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan*)		
TEMPERATURA	0.0001	—		
Temperatura = 4°C		X		
Inóculo	0.0007	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	5.001	A
		<i>Staphylococcus carnosus</i>	4.959	A
		Sin inóculo	4.350	B
Tiempo (h)	0.0734			
		0	4.407	B
		24	4.994	A
		48	4.940	A
		72	4.798	B A
		96	4.711	B A
Temperatura = 19°C				
Inóculo	0.010	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	7.273	A
		<i>Staphylococcus carnosus</i>	7.225	A
		Sin inóculo	5.887	B
Tiempo (h)	0.0035			
		0	4.407	C
		24	6.784	B
		48	7.707	A
		72	7.818	A
		96	7.258	B A

*Letras iguales no son significativamente diferentes.

Tabla 15 Análisis estadístico de la población de *Enterobacteriaceae* (ufc/g).

Fuente de variación	P > F	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan)*		
TEMPERATURA	0.0001		—	
Temperatura - 4°C			X	
Inóculo	0.1295	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	2.857	A
		<i>Staphylococcus carnosus</i>	2.873	A
		Sin inóculo	2.992	A
Tiempo (h)	0.0734			
		0	2.499	C
		24	2.703	B
		48	3.128	A
		72	3.120	A
		96	3.087	A
Temperatura - 19°C				
Inóculo	0.010	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	4.144	B
		<i>Staphylococcus carnosus</i>	4.095	B
		Sin inóculo	4.982	A
Tiempo (h)	0.0035			
		0	3.299	C
		24	4.481	B
		48	4.619	B A
		72	4.718	B A
		96	4.918	A

*Letras iguales no son significativamente diferentes.

Tabla 16 Análisis estadístico para la capacidad de retención de agua (ml de solución de NaCl 0.6 N retenida/5 g de carne).

Fuente de variación	P > F	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan)*		
TEMPERATURA	0.0001			
Temperatura = 4°C			\bar{X}	
Inóculo	0.0421	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	1.550	A
		<i>Staphylococcus carnosus</i>	1.500	A
		Sin inóculo	1.670	B
Tiempo (h)	0.0086			
		0	1.800	C
		24	1.650	B
		48	1.500	A
		72	1.500	A
		96	1.416	A
Temperatura = 19°C				
Inóculo	0.0076	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	0.066	B
		<i>Staphylococcus carnosus</i>	-0.016	B
		Sin inóculo	1.400	A
Tiempo (h)	0.0242	0000		
		0	1.833	C
		24	0.800	B
		48	0.150	B A
		72	0.033	B A
		96	0.083	A

*Letras iguales no son significativamente diferentes.

Tabla 17 Ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) para pH.

TRATAMIENTO	ECUACIÓN	R^2
Cambios en el pH de la carne de cerdo almacenada a 4°C		
Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i>	$Y = -0.0231x^2 + 0.0209x + 6.5377$	0.9523
Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i>	$Y = -0.0331x^2 - 0.0182x + 6.46$	0.9442
Carne sin inóculo	$Y = -0.0437x^2 - 6.2413$	0.9459
Cambios en el pH de la carne de cerdo almacenada a 19°C		
Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i>	$Y = 0.1185x^2 - 1.0049x - 7.039$	0.9043
Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i>	$Y = 0.0894x^2 - 0.7604x - 6.485$	0.939
Carne sin inóculo	$Y = -0.0174x^2 - 0.0762x - 6.1158$	0.9567
	Y = pH; x = tiempo (h)	

Tabla 18 Ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) para ATT.

TRATAMIENTO	ECUACIÓN	R^2
Cambios en la acidez total de la carne de cerdo almacenada a 4°C		
Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i>	$Y = 0.0436x^3 - 0.399x^2 - 1.087x - 0.4602$	0.8158
Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i>	$Y = 0.0452x^2 - 0.4428x - 1.3165$	0.7371
Carne sin inóculo	$Y = 0.0452x^2 - 0.2801x - 0.8908$	0.9548
Cambios en la acidez total de la carne de cerdo almacenada a 19°C		
Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i>	$Y = 0.053x^3 - 0.5097x^2 - 1.4674x - 0.3757$	0.6185
Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i>	$Y = 0.0505x^3 - 0.5043x^2 + 1.475x - 0.4545$	0.6921
Carne sin inóculo	$Y = 0.023x^3 - 0.2881x^2 + 1.0983x + 0.1814$	0.8588
	Y = acidez total titulable (%); x = tiempo (h)	

Tabla 19 Ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) para la CRA.

TRATAMIENTO	ECUACIÓN	R^2
Cambios en la CRA de la carne de cerdo almacenada a 4°C		
Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i>	$Y = 0.017x^2 - 0.212x - 1.99$	0.917
Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i>	$Y = 0.0286x^2 - 0.281x + 2.03$	0.9133
Carne sin inóculo	$Y = 0.0143x^2 - 0.145x + 1.95$	0.9037
Cambios en la CRA de la carne de cerdo almacenada a 19°C		
Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i>	$Y = 0.257x^2 - 2.142x + 3.68$	0.987
Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i>	$Y = 0.307x^2 - 2.462x + 3.99$	0.981
Carne sin inóculo	$Y = 0.0143x^2 - 0.145x + 1.96$	0.7518
	Y -- CRA: x = tiempo (h)	

Tabla 20 Ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) para el color.

TRATAMIENTO	ECUACIÓN	R^2
Cambios en el color de la carne de cerdo almacenada a 4°C		
Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i>	$Y = 18.87\text{Ln}(x) + 76.429$	0.9682
Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i>	$Y = 18.469\text{Ln}(x) + 73.754$	0.8425
Carne sin inóculo	$Y = 14.083\text{Ln}(x) + 76.904$	0.9571
Cambios en el color de la carne de cerdo almacenada a 19°C		
Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i>	$Y = 22.67\text{Ln}(x) - 77.518$	0.9814
Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i>	$Y = 21.563\text{Ln}(x) + 80.555$	0.9696
Carne sin inóculo	$Y = 14.057\text{Ln}(x) - 78.239$	0.9487
	Y = color : x = tiempo (h)	

Tabla 21 Ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) para la textura.

TRATAMIENTO	ECUACIÓN	R^2
Cambios en la textura de la carne de cerdo almacenada a 4°C		
Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i>	$Y = 0.009x^2 - 0.013x + 9.775$	0.9911
Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i>	$Y = 0.0148x^2 - 0.0416x + 9.8102$	0.8749
Carne sin inóculo	$Y = 0.0093x^2 - 0.0375x + 9.7926$	0.9845
Cambios en la texturade la carne de cerdo almacenada a 19°C		
Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i>	$Y = -0.0214x^2 + 0.2184x + 9.554$	0.9536
Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i>	$Y = -0.0085x^2 + 10.1283x + 9.6996$	0.9815
Carne sin inóculo	$Y = 0.0121x^2 - 0.0437x + 9.7964$	0.9881
	$Y = \text{textura} ; x = \text{tiempo (h)}$	

Tabla 22 Ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) para las poblaciones de bacterias lácticas.

TRATAMIENTO	ECUACIÓN	R^2
Bacterias lácticas de la carne de cerdo almacenada a 4°C		
Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i>	$Y = -0.0727x^3 - 0.7729x^2 - 2.44x - 2.955$	0.9633
Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i>	$Y = 0.081x^3 - 0.87x^2 - 2.738x - 2.703$	0.9976
Carne sin inóculo	$Y = -0.0304x^3 - 0.315x^2 - 0.987x + 5.247$	0.9516
Bacterias lácticas de la carne de cerdo almacenada a 19°C		
Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i>	$Y = -0.5944x^2 - 4.306x + 1.024$	0.9974
Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i>	$Y = -0.5948x^2 + 4.2878x + 1.161$	0.9648
Carne sin inóculo	$Y = 1.435\text{Ln}(x) - 4.544$	0.9599
	$Y = \text{bacterias lácticas (ufc/g)} ; x = \text{tiempo (h)}$	

Tabla 23 Ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) para las poblaciones de *Enterobacteriaceae*.

TRATAMIENTO	ECUACIÓN	R^2
Enterobacterias de la carne de cerdo almacenada a 4°C		
Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i>	$Y = 0.103x^3 - 1.042x^2 - 3.367x + 0.8876$	0.9851
Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i>	$Y = -0.0666x^3 - 0.667x^2 - 2.276x + 1.6322$	0.997
Carne sin inculo	$Y = -0.023x^3 - 0.362x^2 - 2.179x + 2.179$	0.9829
Enterobacterias de la carne de cerdo almacenada a 19°C		
Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i>	$Y = -0.0214x^3 - 0.128x^2 - 0.0009x + 2.42$	0.9186
Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i>	$Y = -0.0349x^3 - 0.2296x^2 - 0.1985x - 2.52$	0.8758
Carne sin inculo	$Y = -0.0234x^3 - 0.3622x^2 - 2.1794$	0.9829
	$Y = \text{Enterobacterias (ufc/g)} ; \text{ tiempo (h)}$	

PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRÓN DE ÁCIDO LÁCTICO Y ACÉTICO.

Para la obtención de la curva patrón de ácido láctico y acético, se utilizaron 50, 100 y 150 microlitros de ácido láctico (Baker, E.U.) y acético (Reasol, México) en forma individual, los cuales se llevaron a un volumen de 10 ml con agua destilada. A partir de esta solución se tomaron 2 ml de cada uno y se metilaron según la técnica mencionada en la sección 5.5. Se inyectaron en el cromatógrafo de gases 5 microlitros de la mezcla.

Tabla 24. Areas obtenidas de ácido láctico y acético a diferentes concentraciones.

Ácido	Concentración (microlitros/ml)	Área (unidades de área)
Láctico	5	2837287
Láctico	10	6558303
Láctico	15	8852335
Acético	5	13767007
Acético	10	24268657
Acético	15	41163350

A partir de los datos anteriores se realizó un ajuste de regresión en Excel 4.0, obteniéndose las curvas patrón que se muestran en las Fig. 24 y 25.

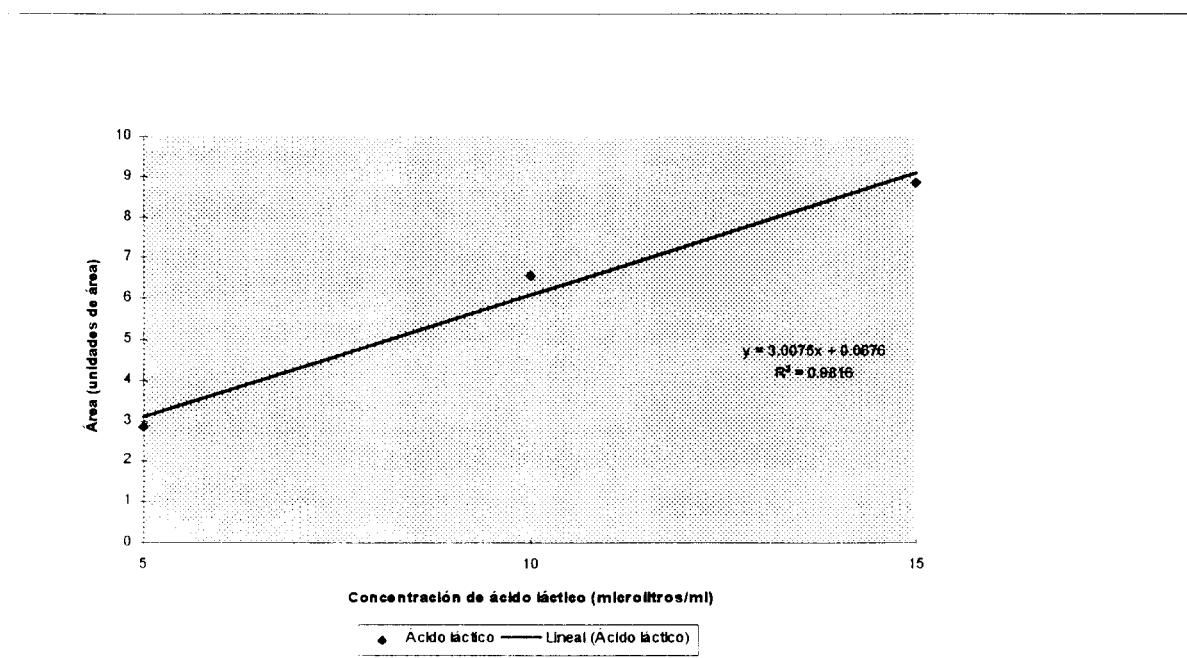


Fig. 24 Curva patrón para ácido láctico.

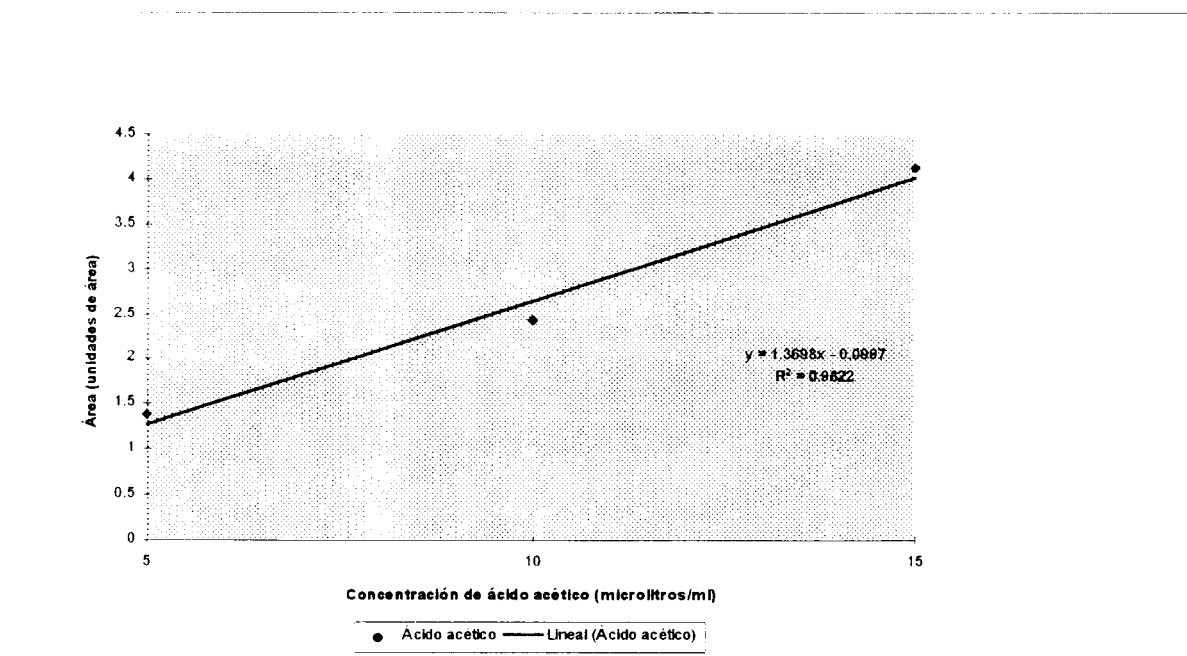


Fig. 25 Curva patrón para ácido acético.

Tabla 25. Concentración de ácido láctico y acético en carne de cerdo fermentada y control, almacenada a 4 y 19°C (mg/g de carne) *

Tiempo (h)	Temperatura de 4°C						Temperatura de 19°C					
	Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i>		Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i>		Carne control		Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i>		Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i>		Carne control	
	Ac. láctico	Ac. acético	Ac. láctico	Ac. acético	Ac. láctico	Ac. acético	Ac. láctico	Ac. acético	Ac. láctico	Ac. acético	Ac. láctico	Ac. acético
0	2.4064	0.348	2.406	0.348	2.406	0.348	2.406	0.348	2.406	0.348	2.406	0.348
48	4.119	1.258	4.251	1.258	2.860	0.9556	5.936	1.492	6.253	1.592	3.455	1.535
96	2.789	2.445	2.888	2.172	1.985	2.172	5.217	2.933	4.858	3.155	3.101	2.676

* Promedio de dos mediciones.

CURVA PATRÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA LARGA.

Para la obtención de la curva patrón de los ácidos grasos de cadena larga se utilizó una mezcla de estándares de referencia de metil ésteres SIGMA AOCS No. 6, 0-7631 (Sigma Chemical, St. Louis, E.U.) de ácidos mirístico 14:0 + palmítico 16:0 + palmitoleico 16:1 + esteárico 18:0 + oléico 18:2 + linoléico 18:3. En esta mezcla de ácidos grasos se adicionaron 100 μ l de hexano. A partir de esta solución se inyectaron en el cromatógrafo con las condiciones referidas en la sección 5.4.2 concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 μ l. El porcentaje de composición de la mezcla de ácidos grasos se muestra en la Tabla 27.

Tabla 26. Composición de los metil ésteres de los ácidos grasos estándares.

Ácido graso	Composición de la mezcla de metil ésteres de los ácidos grasos (%)
Metil éster de ácido mirístico	2.0
Metil éster de ácido palmítico	30.0
Metil éster de ácido palmitoleico	3.0
Metil éster de ácido esteárico	14.0
Metil éster de ácido oléico	41.0
Metil éster de ácido linoléico	7.0
Metil éster de ácido linoléico	3.0

De los resultados obtenidos de las áreas se determinaron las curvas patrón por ajuste de regresión de Area vs Concentración de ácidos grasos (mg/ μ l) que se muestran a continuación.

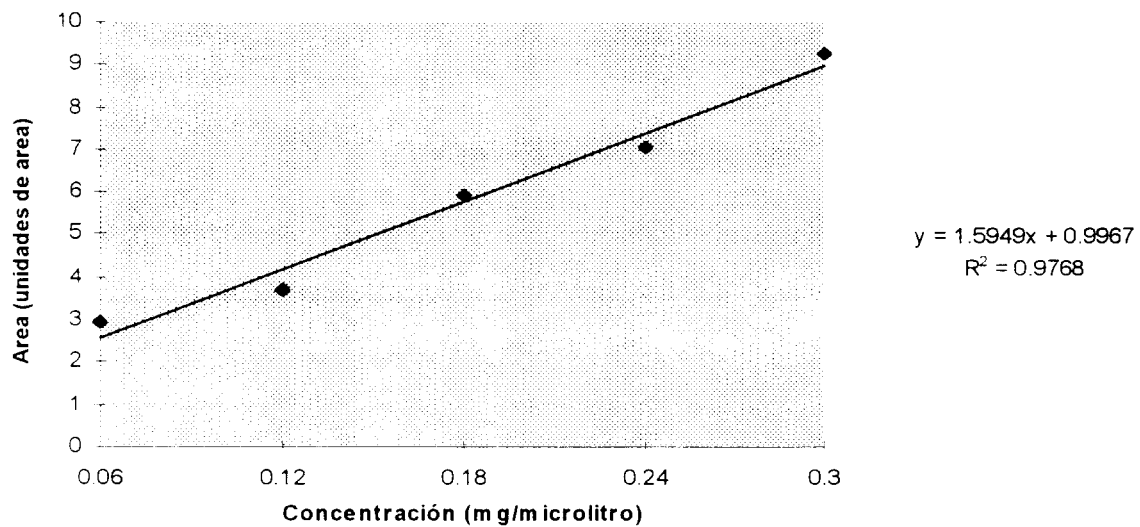


Fig. 26 Curva patrón para ácido palmítico.

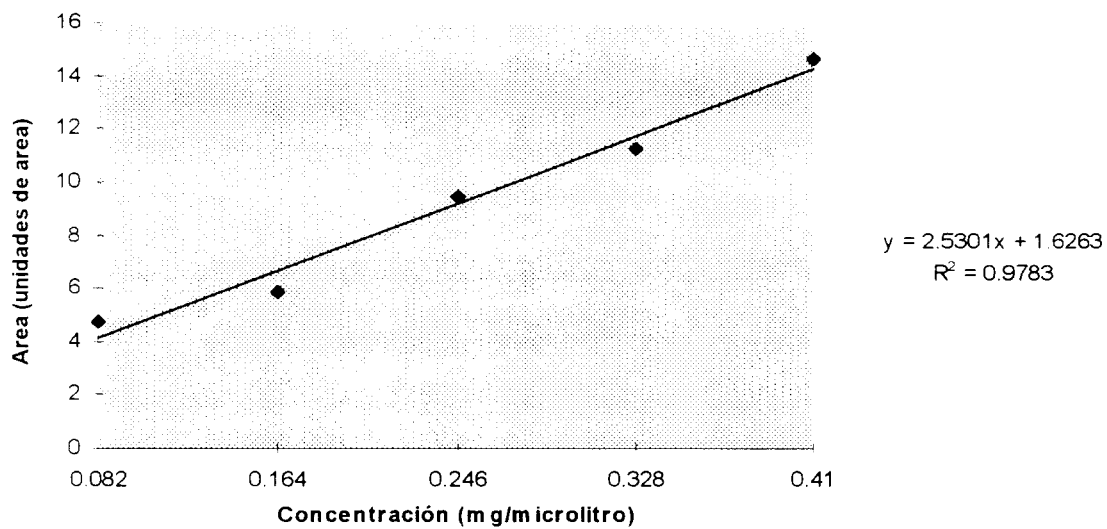


Fig. 27 Curva patrón para ácido oleico.

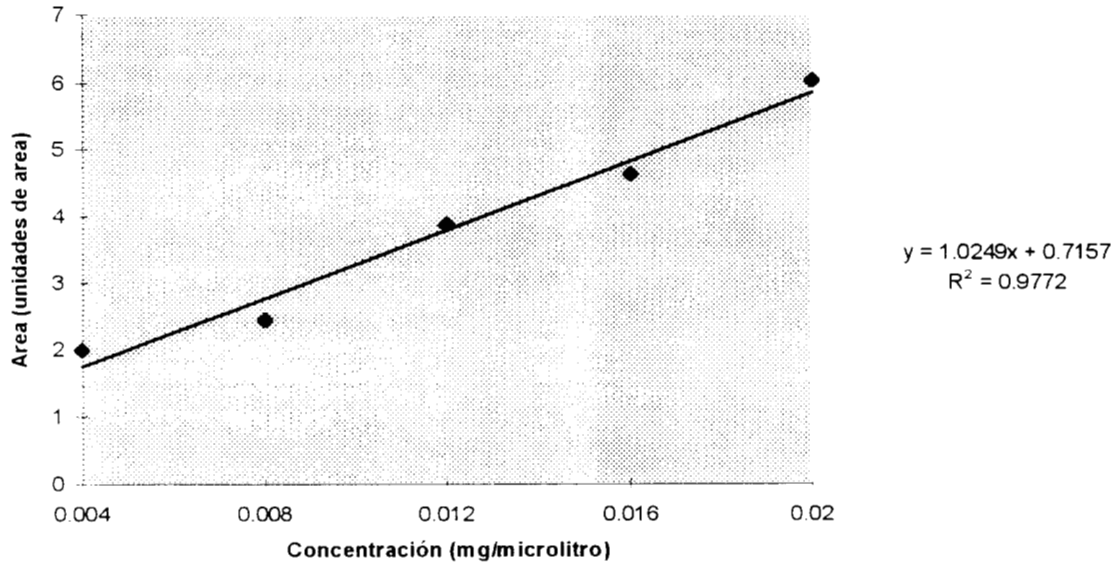


Fig. 28 Curva patrón para ácido mirístico.

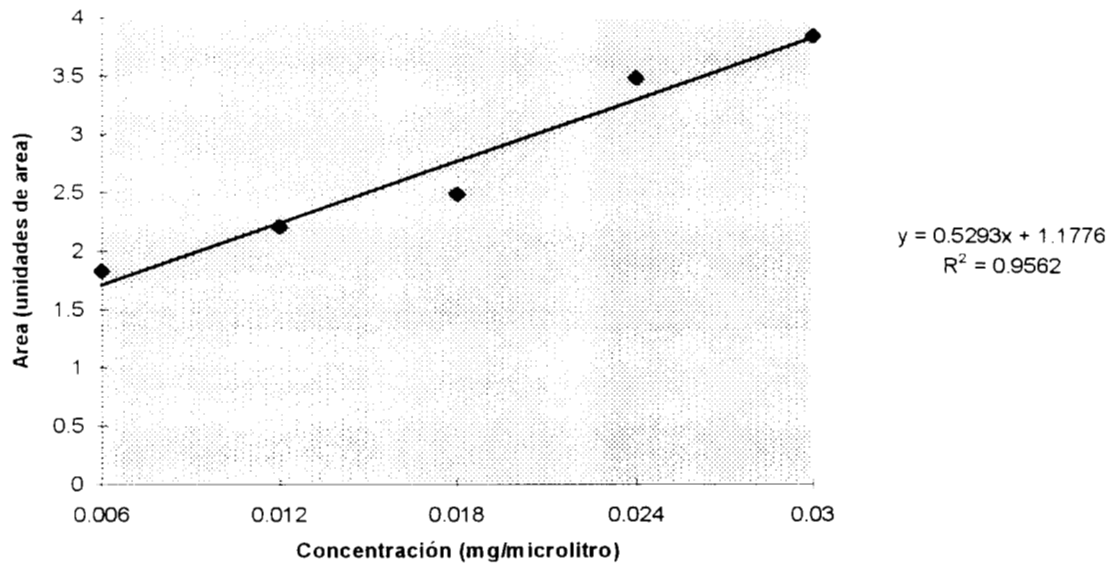


Fig. 29 Curva patrón para ácido linolénico.

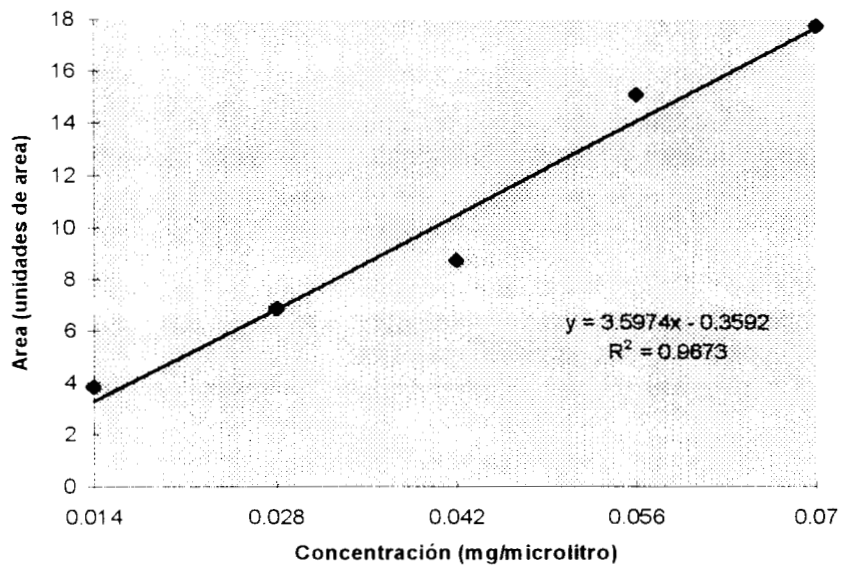


Fig. 30 Curva patrón para ácido linoléico.

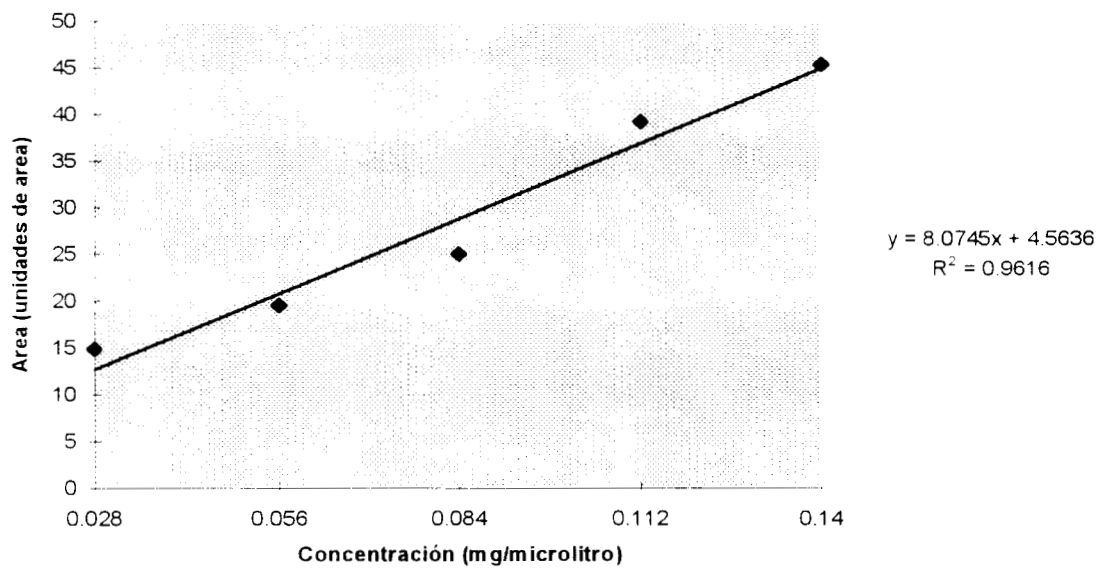


Fig. 31 Curva patrón para ácido esteárico.

Tabla 27. Concentración de ácidos grasos de cadena larga en carne de cerdo fermentada y control, almacenada a 4 y 19°C (mg/100 g de carne) *

Tiempo (h)	Ácido graso	Tiempo de retención	Temperatura de 4°C			Temperatura de 19°C		
			Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i>	Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i>	Carne control	Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i>	Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i>	Carne control
0	Mirístico	2.6-2.9	25.3	25.3	25.3	108	25.3	25.3
	Palmitico	3.7-4.1	37.4	37.4	37.4	37.4	37.4	37.4
	Estearico	9.3-10.4	29.2	29.2	29.2	29.2	29.2	29.2
	Oléico	11.2-12.5	76.4	76.4	76.4	76.4	76.4	76.4
	Linoléico	13.8-14.9	57.8	57.8	57.8	57.8	57.8	57.8
	Linolénico	21.9-22.2	40.8	40.8	40.8	40.8	40.8	40.8
48	Mirístico	3.6-3.8	62.4	31.8	40.2	62.4	97.4	78.88
	Palmitico	6.1-6.6	45.6	39.0	47.4	157.8	117.7	71.2
	Estearico	10.7-11.7	77.2	85.0	70.8	112.6	84.6	112.6
	Oléico	12.5-13.7	52.62	39.8	23.2	91.2	170.4	91.2
	Linoléico	15.6-16.3	95.3	85.0	155.6	157.8	197.4	157.8

96	Linolénico	21.6-23.8	33.1	29.4	50.2	225.4	397.0	225.4
	Mirístico	3.6-3.7	131.6	158.21	102.2	131.4	205.5	53.18
	Palmitico	6.1-6.2	104.6	71.6	80.8	197.0	312.6	197.0
	Esteárico	10.7-10.8	171.2	157.0	97.8	170.4	246.0	170.4
	Oléico	12.3-12.6	92.62	65.8	78.88	130.2	370.4	130.2
	Linoléico	15.8-16.5	160.4	102.5	79.6	192.6	305.2	192.6
	Linolénico	21.5-21.7	75.4	65.1	65.1	288.42	508.6	288.42

Tabla 28. pH de carne de cerdo fermentada y control, almacenada a 4 y 19°C *

Tiempo (h)	Temperatura de 4°C						Temperatura de 19°C					
	Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i>		Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i>		Carne control		Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i>		Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i>		Carne control	
	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ
0	6.315	0.080	6.283	0.075	6.46	0.080	6.257	0.185	5.880	0.063	6.180	0.040
24	6.346	0.060	6.283	0.097	6.33	0.060	5.240	0.125	5.27	0.081	6.160	0.052
48	6.17	0.0611	5.855	0.015	6.4	0.0611	5.267	0.025	5.03	0.050	6.290	0.110
72	6.066	0.083	5.83	0.091	6.34	0.0832	4.953	0.067	4.92	0.065	5.920	0.216
96	5.623	0.115	5.46	0.138	6.34	0.115	4.930	0.030	4.66	0.174	5.980	0.219

* Promedio de tres mediciones.

Tabla 29. Acidez total titulable (ATT) de carne de cerdo fermentada y control, almacenada a 4 y 19°C.*

Tiempo (h)	Temperatura de 4°C						Temperatura de 19°C					
	Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i>		Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i>		Carne control		Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i>		Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i>		Carne control	
	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ
0	1.182	0.091	1.094	0.086	1.121	0.053	1.363	0.090	1.454	0.090	0.996	0.015
24	1.424	0.105	1.485	0.053	1.303	0.053	1.788	0.139	1.879	0.053	1.485	0.139
48	1.242	0.052	1.273	0.090	1.363	0.001	1.485	0.139	1.576	0.105	1.394	0.052
72	1.242	0.052	1.333	0.053	1.333	0.189	1.576	0.105	1.606	0.189	1.515	0.052
96	1.341	0.027	1.333	0.053	1.273	0.090	1.576	0.053	1.515	0.052	1.333	0.105

* Promedio de tres mediciones.

Tabla 30. Color (sistema L,a y b) de carne de cerdo fermentada y control, almacenada a 4 y 19°C

Tiempo (h)	Temperatura de 4°C										Temperatura de 19°C										
	Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i>		Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i>		Carne control		Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i>		Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i>		Carne control		Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i>		Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i>		Carne control				
0	L*	96.136	a*	-5.643	b*	-1.276	ΔE*	96.317	88.993	102.02	95.58	101.86	101.88	111.86	111.86	108.40	105.15	96.863	5.046	1.073	96.995
24	L*	77.695	1.592	2.953	0.68	11.3	78.387	80.433	-0.633	3.796	0.913	102.02	77.76	111.86	1836	108.40	77.76	78.387	1.592	11.3	78.387
48	L*	86.676	2.953	0.68	0.68	2.286	80.533	80.433	-0.633	3.796	0.913	85.204	91.173	0.39	3.573	91.257	99.203	85.776	3.43	1.966	85.874
72	L*	96.136	-5.643	-1.276	1.276	0.913	91.698	88.993	3.796	3.796	1.836	90.500	101.88	2.5	0.136	101.91	105.15	96.863	5.046	1.073	96.995
96	L*	101.64	1.443	-5.4	5.4	-0.036	101.79	102.02	-0.273	-0.273	95.58	111.86	112.4*	111.86	3.78	111.70	108.40	97.493	2.603	6.02	97.723
		109.23	-1.386	1.623	1.623	6.186	109.35	106.88	-4.426	-4.426	101.86	112.4*	112.4*	112.4*	5.863	112.62	114.48	99.372	3.856	3.463	99.510

* Promedio de tres mediciones.

Tabla 31. Fuerza (N) necesaria para comprimir en 50% carne de cerdo fermentada y control, almacenada a 4 y 19°C.*

Tiempo (h)	Temperatura de 4°C						Temperatura de 19°C					
	Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i>		Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i>		Carne control		Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i>		Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i>		Carne control	
	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ
0	9.767	0.1601	9.767	0.1601	9.767	0.1601	9.767	0.1601	9.767	0.1601	9.767	0.1601
24	9.798	0.3106	9.815	0.0940	9.7645	0.2388	9.8825	0.0353	9.883	0.0466	9.755	0.3606
48	9.816	0.1076	9.830	0.1185	9.77	0.0353	10.06	0.1153	9.934	0.18706	9.77	0.1046
72	9.873	0.1527	9.836	0.1631	9.79	0.1060	10.075	0.1116	10.046	0.0986	9.825	0.2050
96	9.952	0.15087	9.992	0.1524	9.845	0.1909	10.111	0.1125	10.073	0.1594	9.878	0.3702

* Promedio de tres mediciones.

Tabla 32. Capacidad de retención de agua (ml de solución NaCl 0.6 N retenida/5 g de carne) carne de cerdo fermentada y control, almacenada a 4 y 19°C.*

Tiempo (h)	Temperatura de 4°C						Temperatura de 19°C					
	Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i>		Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i>		Carne control		Carne fermentada con <i>Lactobacillus alimentarius</i>		Carne fermentada con <i>Staphylococcus carnosus</i>		Carne control	
	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ
0	1.8	0.141	1.8	0.141	1.8	0.141	1.8	0.141	1.9	0.070	1.8	0.141
24	1.65	0.070	1.55	0.070	1.75	0.070	0.45	0.070	0.2	0.070	1.75	0.070
48	1.45	0.141	1.4	0.141	1.65	0.070	-0.55	0.212	-0.75	0.070	1.75	0.070
72	1.5	0.070	1.45	0.070	1.55	0.212	-0.65	0.070	-0.7	0.141	1.45	0.070
96	1.35	0.141	1.3	0.141	1.6	0.141	-0.65	0.070	-0.75	0.070	1.65	0.070

* Promedio de dos mediciones.

Tabla 33. Composición del caldo MRS (Merck).

Componente	g/l
Peptona de caseína	10.0
Extracto de carne	8.0
Extracto de levadura	4.0
D (+) glucosa	20.0
Fosfato de hidrógeno dipotásico	2.0
Tween 80	1.0
Citrato de hidrógeno di-amonio	2.0
Acetato de sodio	5.0
Sulfato de magnesio	0.2
Sulfato de manganeso	0.04

Tabla 34. Composición del agar de bilis y rojo violeta (Bioxon).

Componente	g/l
Extracto de levadura	3.0
Peptona de gelatina	7.0
Mezcla de sales biliares	1.50
Lactosa	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0
Rojo neutro	0.03
Cristal violeta	0.002
pH final = 7.4 ± 0.2	