



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

---

**APLICACIÓN DE ANTIMICROBIANOS Y SU EFECTO EN LA VIDA  
DE ANAQUEL DE PRODUCTOS CÁRNICOS DE CARNE DE OVINO**

---

**TESIS**

---

Que para obtener el Diploma de

**Especialista en Biotecnología**

**P R E S E N T A**

**ROSALÍA RUTH FERNÁNDEZ SOTO**

Directoras de Tesis:

**DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA**

**DRA. YENIZEY MERIT ÁLVAREZ CISNEROS**

**MÉXICO, DISTRITO FEDERAL**

**JULIO 2011**



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

No. 00089

Matrícula: 210280044

APLICACION DE  
ANTIMICROBIANOS Y SU EFECTO  
EN LA VIDA DE ANAQUEL DE  
PRODUCTOS CARNICOS DE CARNE  
DE OVINO

En México, D.F., se presentaron a las 12:00 horas del día 5 del mes de julio del año 2011 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA  
DRA. YENIZEY MERIT ALVAREZ CISNEROS  
M. EN B. ISADORA MARTINEZ ARELLANO

siendo las dos primeras asesoras de la alumna y lectora la última, de la Idónea Comunicación de Resultados, se reunieron a evaluar la presentación cuya denominación aparece al margen, para la obtención del diploma de:

ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA

DE: ROSALIA RUTH FERNANDEZ SOTO

y de acuerdo con el artículo 79 fracción II del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*Aprobar*

Acto continuo, se comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



ROSALIA RUTH FERNANDEZ SOTO  
ALUMNA

REVISO

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS

DR. RUBEN ROMAN RAMOS

ASESORA

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

ASESORA

DRA. YENIZEY MERIT ALVAREZ CISNEROS

LECTORA

M. EN B. ISADORA MARTINEZ ARELLANO



Iztapalapa, D.F. a 5 de Julio de 2011.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad  
Iztapalapa aprobó la Idónea Comunicación de Resultados:

Que presentó:

**Rosalía Ruth Fernández Soto**

Directoras de Tesis:

**DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA**

\_\_\_\_\_

**DRA. YENIZEY MERIT ÁLVAREZ CISNEROS**

\_\_\_\_\_

Lectora de Tesis:

**M. en B ISADORA MARTÍNEZ ARELLANO**

\_\_\_\_\_

El presente trabajo forma parte del proyecto “Calidad de carne de cordero, industrialización y desarrollo de nuevos productos a nivel comercial “, con clave 2006-45840 financiado por el Fondo sectorial de investigación en materias agrícola, pecuaria, acuacultura, agrobiotecnología y recursos fitogenéticos, SAGARPA-CONACYT.

## **AGRADECIMIENTOS**

*A Dios, cuya fuerza actúa en nosotros y que puede realizar mucho más de lo que pedimos o imaginamos... Ef. 3.20*

*A la Dra. Edith por darme la oportunidad de colaborar en este proyecto; muchísimas gracias Dra., por enseñarme la forma correcta de hacer las cosas, porque su sonrisa siempre me tranquilizó en los momentos de stress, por su comprensión y por su gran apoyo en todo lo que necesite para realizar la especialidad.*

*A la Dra. Yeni por enseñarme desde siempre, con muy buena disposición, paciencia y disciplina, por tu amistad tan valiosa y por muchas cosas más te estaré profundamente agradecida.*

*Al Dr. Héctor por su gran ayuda en el análisis estadístico y por enseñarme la estadística con manzanitas, mil gracias.*

*A la M.B. Isa por haber trabajado arduamente en la lectura y las correcciones de la tesis, por siempre estar al pendiente de mi, por espérame siempre que acaba tarde, que era siempre!!! . Por tu apoyo incondicional muchas gracias Isita.*

*A todos mis compañeros miembros del ahora Laboratorio 132, por siempre hacer un ambiente agradable, por su amistad y por su apoyo en especial de mi hermano mayor M.B.Luisito, por enseñarme la técnica de TBARS, junto con Isabel muchas gracias.*

## *ÍNDICE GENERAL*

<i>ÍNDICE GENERAL</i> .....	VI
Indice de tablas .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Indice de figuras .....	IX
Resumen.....	XI
Abstract .....	XIII
INTRODUCCIÓN .....	15
JUSTIFICACIÓN .....	16
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	17
<i>3.1 La carne y productos cárnicos</i> .....	17
<i>3.2 Valor nutritivo de la carne de ovino</i> .....	17
<i>3.3 Factores que determinan la calidad de la carne</i> .....	17
<i>3.4 Factores que influyen en la contaminación microbiana</i> .....	18
<i>3.4.1 Factores intrínsecos</i> .....	18
<i>3.4.2 Factores extrínsecos</i> .....	20
<i>3.5 Microbiología de la carne refrigerada</i> .....	20
<i>3.6 Microbiología de la carne congelada</i> .....	21
<i>3.7 Microbiología de la carne empacada</i> .....	21
<i>3.8 Microbiología de la carne enlatada</i> .....	21
<i>3.9 Aditivos</i> .....	22
<i>3.9.1 Conservadores</i> .....	22
<i>3.10 Bacteriocinas de las bacterias lácticas</i> .....	24
<i>3.10.1 Características de las bacteriocinas</i> .....	25
<i>3.10.2 Modo de acción e las bacteriocinas</i> .....	25
<i>3.11 Vida de anaquel de productos cárnicos</i> .....	26
<i>3.11.1 Métodos para prolongar la vida útil</i> .....	26
<i>3.11.2 Método para estimación de vida útil</i> .....	27
<i>3.11.3 Parámetros de calidad de la carne</i> .....	28
HIPÓTESIS.....	32
OBJETIVO GENERAL.....	32

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
6.1 Fase 1 .....	35
6.1.1 Activación y crecimiento de microorganismos .....	35
6.1.2 Extracción de la bacteriocina .....	35
6.1.3 Actividad inhibitoria de la bacteriocina .....	35
6.1.4. Pruebas de susceptibilidad microbiana.....	36
6.1.5. Análisis estadístico de la Fase 1. ....	40
6.2 Fase 2.....	40
6.2.1 Determinación de la vida de anaquel de birria de carne de ovino enlatada .....	40
6.2.2 Determinación de vida de anaquel de fajitas marinadas de carne de cordero .....	41
6.2.3 Determinación de la vida de anaquel de hamburguesa de carne de ovino.....	41
6.3 Determinación de los parámetros de calidad .....	41
6.3.1 Análisis microbiológico.....	41
6.3.2 Medición de pH .....	42
6.3.3 Medición del color .....	42
6.3.4 Determinación de Rancidez .....	42
RESULTADOS .....	44
7.1 Fase 1 .....	44
7.1.1 Actividad Inhibitoria.....	44
7.1.2 Análisis estadístico. ....	45
7.1.3 Análisis Microbiológico .....	46
7.2 pH .....	52
7.3. Color .....	54
7.3.1 Cromaticidad .....	60
7.3.2 Tonalidad.....	62
7.4 Fase 2.....	65
7.4.1 Vida de anaquel de birria de cordero enlatada.....	65
7.4.2 Vida de anaquel de fajitas marinadas de carne de ovino.. ....	66
7.4.3 Vida de anaquel de hamburguesas de carne de ovino .....	67
CONCLUSIÓN .....	70
REFERENCIAS.....	71
ANEXOS.....	79

ANEXO 1 .....	79
ANEXO 2 .....	85
ANEXO 3 .....	87
ANEXO 4 .....	92
ANEXO 5 .....	131

## Índice de figuras

Figura 1 Componentes del color: L*, a* y b* .....	29
Figura 2. Las magnitudes colorimétricas, el tono (h°) y el croma (C). .....	30
Figura 3 Diagrama de flujo .....	34
Figura 4. Actividad antimicrobiana del extracto de bacteriocina producido por : <i>Enterococcus faecalis</i> MVK22. ....	44
Figura 5. Medias marginales de las combinaciones bacteriocina-sorbato de potasio (123, 132,135,155), bacteriocina- lactato de sodio (235, 243, 252, 253, 255) y bacteriocina-nitrito de sodio (322, 324, 325, 334, 335) con respecto a la población de mesófilos. ....	47
Figura 6. Medias marginales de las combinaciones bacteriocina-sorbato de potasio (134, 142,143,152,155),bacteriocina- lactato de sodio (235, 243, 252, 253, 255) y bacteriocina-nitrito de sodio (323, 324, 332, 334, 335) con respecto a la población de <i>E. coli</i> JMP 101.....	48
Figura 7. Medias marginales de las combinaciones bacteriocina-sorbato de potasio (114, 115, 121, 131, 135), bacteriocina- lactato de sodio (235, 243, 252, 253, 255) y bacteriocina-nitrito de sodio (323, 324, 332, 334, 335) con respecto a la población de <i>Coliformes</i> . ....	49
Figura 8. Efecto inhibitorio de la combinación bacteriocina-sorbato de potasio(155), bacteriocina-lactato de sodio(252) y bacteriocina-nitrito de sodio(335), sobre la cuenta viable de <i>E. coli</i> JMP 101 en el almacenamiento a 4 °C durante 9 días. ....	51
Figura 9. Medias marginales de las combinaciones bacteriocina-sorbato de potasio (114, 115, 141,144,145), bacteriocina-lactato de sodio (232, 243, 252, 253, 255) y bacteriocina-nitrito de sodio (311,315,341,354,355) con respecto al pH.....	53
Figura 10. Variación del pH de las combinaciones de bacteriocina- sorbato de potasio(155) y bacteriocina-lactato de sodio (252) y bacteriocina,-nitrito de sodio(335), en el almacenamiento a 4 °C durante 9 días. ....	54
Figura 12. Variación de la luminosidad de las combinaciones bacteriocina-sorbato de potasio (155), bacteriocina-lactato de sodio (252), bacteriocina-nitrito de sodio (335) y el control (carne), en el almacenamiento durante 9 días a 4 °C.....	56
Figura 13. Medias marginales de las combinaciones bacteriocina-sorbato de potasio (115,121,131,153,155), bacteriocina- lactato de sodio (222, 223, 234, 243, 252) y bacteriocina-nitrito de sodio (322,323,324,325,332) con respecto al componente a*.....	57
Figura 14. Variación del componente a* del color de las combinaciones de bacteriocina-sorbato de potasio (155), bacteriocina-lactato de sodio (252), bacteriocina-nitrito de sodio (335) y el control durante el almacenamiento a 4 °C .....	58
Figura 15. Medias marginales de las combinaciones de bacteriocina-sorbato de potasio (123,124,132,134,145), bacteriocina-lactato de sodio(224,225,234,235,255) y bacteriocina nitrito de sodio(351,352,353,354,355), con respecto a la variable respuesta del componente del color: b* .....	59
Figura 16. Variación del componente a* del color de las combinaciones de bacteriocina-sorbato de potasio (155), bacteriocina-lactato de sodio (252), bacteriocina-nitrito de sodio(335) y el control durante el almacenamiento a 4 °C .....	60
Figura 17. Medias marginales de las combinaciones de bacteriocina-sorbato de potasio (114,121,131,153,155), bacteriocina-lactato de sodio (223,232,243,252,253) y bacteriocina nitrito	

de sodio (323,324,334,335,344), con respecto a la variable respuesta de cromaticidad, durante el almacenamiento a 4 °C .....	61
Figura 18. Variación de la cromaticidad de las combinaciones: bacteriocina-sorbato de potasio (155), bacteriocina-lactato de sodio (252), bacteriocina-nitrito de sodio (335) y el control durante el almacenamiento a 4 °C .....	62
Figura 19. Medias marginales de las combinaciones de bacteriocina-sorbato de potasio (132,152,153,154,155), bacteriocina-lactato de sodio (235,243,252,253,255) y bacteriocina nitrito de sodio (332,333,334,335,344), con respecto a la variable respuesta de tonalidad, durante el almacenamiento a 4 °C .....	63
Figura 20. Variación de la tonalidad de las combinaciones:bacteriocina-sorbato de potasio (155), bacteriocina-lactato de sodio (252), bacteriocina-nitrito de sodio ( 335) y el control durante el almacenamiento a 4 °C .....	64
Figura 21. Fajitas marinadas de carne de cordero MAO y marinado comercial MAK a 4 °C, en el día 14 de almacenamiento .....	67
Figura 22. Hamburguesas de carne de ovino (O), en atmosfera modificada (AMO), marca comercial (SK), en atmosfera modificada (AMSK), a 4 °C en el día 14 de almacenamiento .....	69
Figura 23. Velocidad específica $\mu$ y temperatura para variaciones de pH. ....	131
Figura 24. Velocidad específica $\mu$ y temperatura para variaciones de rancidez. ....	132
Figura 25. Velocidad específica $\mu$ y temperatura para variaciones de cuenta viable de mesófilos. ....	133
Figura 26. Velocidad específica $\mu$ y temperatura para variaciones de pH. ....	134
Figura 27. Velocidad específica $\mu$ y temperatura para variaciones del diferencial de color. ....	134
Figura 28. Velocidad específica $\mu$ y temperatura para variaciones de rancidez. ....	135
Figura 29. Velocidad específica $\mu$ y temperatura para variaciones de cuenta viable de mesófilos. ....	136
Figura 30. Velocidad específica $\mu$ y temperatura para variaciones de pH .....	137
Figura 31. Velocidad específica $\mu$ y temperatura para variaciones del diferencial del color.....	137
Figura 32. Velocidad específica $\mu$ y temperatura para variaciones de rancidez. ....	138

## Resumen

El proyecto se estructuró en dos fases, en la primera fase se evaluó el efecto combinado de agentes antimicrobianos (bacteriocina producida por *Enterococcus faecalis* MXVK22, sorbato de potasio, lactato de sodio y nitrito de sodio) sobre la vida de anaquel de carne de ovino empleando *Escherichia Coli* JMP 101 como microorganismo reto; la segunda fase se determinó la vida de anaquel de tres productos cárnicos.

La bacteriocina producida por *Enterococcus faecalis* MXVK22 es un agente antimicrobiano natural, que tiene un gran potencial como bioconservador. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto antimicrobiano del extracto de bacteriocina (EB) en combinación con sorbato de potasio (SP), lactato de sodio (LS) y nitrito de sodio (NS) sobre la vida de anaquel y calidad de carne de ovino. El EB se obtuvo de un cultivo de 16 h de *E. faecalis* en (caldo CGC a 37 ° C), después se centrifugó (3100 × g durante 20 min, a 4°C), se ajustó a pH 6.5 y se liofilizó. Se utilizó un arreglo de ajedrez para evaluar todas las combinaciones de la bacteriocina con los antimicrobianos, las concentraciones usadas fueron EB (50 UA/g-400 UA/g), NS (0.0625-0.500 mg/g), SP (62.5-5 mg/g) y LS (0.096-0.77 mL/g). Para cada mezcla se ocupó 5 mL del antimicrobiano A, añadiendo 5 mL del antimicrobiano B y 10 mL de inóculo con *E. coli* ( $5 \times 10^5$  UFC/mL). Las diferentes soluciones se adicionaron a la carne de ovino previamente molida. Las muestras fueron empacadas con película impermeable al oxígeno y almacenadas a 4 ° C; el control no tuvo antimicrobianos. Se muestreó los días 0, 3, 6, y 9. Las variables en estudio fueron cuenta viable de *E. coli*, mesófilos y coliformes, pH y color. El análisis estadístico se empleó un análisis de varianza (ANDEVA), utilizando un diseño factorial con 2 factores, con 4 niveles (0, 3, 6 y 9 días de almacenamiento) y 5 niveles de prueba (1, 2, 3, 4 y 5 concentraciones) formando el arreglo factorial de 4 x 5. Todas las variables que presentaron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), las cuales fueron analizadas por medio de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey b, adicionalmente se obtuvieron los gráficos de las medias marginales estimadas para los niveles de factores y las interacciones entre los factores, por cada variable respuesta. Los datos obtenidos, fueron analizados conforme a los parámetros de calidad reportados (NOM-034-SSA1-1993), para carne de ovino y del control positivo (carne) en el caso del color, seleccionando la mejor combinación por

conservador, (BE 400 UA/g / LS 0.096 mL/g), (BE 400 UA/g / PS 5 mg/g) y (BE 100 UA/g / NS 0.5 mg/g). Por lo tanto, la bacteriocina producida por *E. faecalis* MXVK22 en combinación con LS, SP, y NS, puede ser usada como agente antimicrobiano natural ya sea sola o como parte de una tecnología de barreras.

Por otro lado, para determinar la vida de anaquel de los tres productos cárnicos se evaluaron los parámetros de calidad: análisis microbiológico, pH, color y rancidez. La vida de anaquel, tomando en cuenta el valor límite para cada parámetro de calidad. La vida de anaquel estimada para la Birria a 25 ° C, en la muestra Bb (tomada de abajo de la lata) fue de 13 meses, mientras que para la marca comercial fue de 56 meses, siendo la variable limitante la rancidez, cabe señalar que en el análisis microbiológico a 37 ° C, solo se obtuvo cuenta viable a los tres meses de almacenamiento. La vida de anaquel a 4 °C, para la hamburguesa de ovino (O), en película impermeable al oxígeno fue de 20 días y en atmosfera modificada (AMO) fue de 21 días, siendo la variable limitante la cuenta viable de mesófilos, a diferencia de la marca comercial (SK) que fue de 6 días, y en atmosfera modificada (AMSK) fue de 8 días. La vida de anaquel a 4 °C, para el marinado de ovino fue de 11.3 días, y para la marca comercial fue de 11.8.

## Abstract

The project was structured in two phases, the first phase was evaluated the combined effect of antimicrobial agents (bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* MXVK22, potassium sorbate, sodium lactate and sodium nitrite) on the shelf life of ovine meat, using *Escherichia coli* JMP 101 as an organism, the second phase was determined the shelf life of three meat products.

The bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* MXVK22 is a natural antimicrobial agent, which has capacity as biopreservative. The objective was to evaluate the antimicrobial effect of bacteriocin extract (BE) in combination with potassium sorbate (PS), sodium lactate (SL) and sodium nitrite (SN) on the quality and the shelf life ovine meat. The BE was obtained from a 16 hours *E.faecalis* MXVK22 in Casein glucose broth (CGB) at 37 ° C, then it was centrifuged (3100 × g during 20 min at 4 ° C), adjusted to pH 6.5 and freeze-dried. It was used a checkerboard to evaluate the combinations of different concentrations of the bacteriocin with antimicrobial concentrations BE (50 to 400 AU / g), SN (0.0625 to 0.500 mg / g), PS (62.5-5 mg / g) and SL (0.096 to 0.77 mL / g). For each took 5 mL mixture of antimicrobial A, adding 5 mL of the antimicrobial B and 10 mL of *Escherichia coli* JMP 101 ( $5 \times 10^5$  CFU/mL) inoculate was prepared from an isolated stock, and added with each of the tested preservative solutions previously prepared. The samples were packed in oxygen impermeable film and stored at 4 ° C, the antimicrobials had no control. It was sampled on days 0, 3, 6, and 9. The variables were studied total viable counts of *E. coli*, coliform and mesophiles, as well pH and color. Statistical analysis used analysis of variance (ANOVA) using a factorial design with 2 factors, 4 levels (0, 3, 6 and 9 days of storage) and 5 levels of evidence (1, 2, 3, 4 and 5 concentrations) forming the factorial arrangement of 4 x 5. All variables that showed significant difference ( $p < 0.05$ ) level, which were analyzed by the multiple comparison test of Turkey B additionally were obtained the graphs of the estimated marginal means for levels of factors and interactions between factors for each response variable. The data were analyzed according to the quality parameters reported (NOM-034-SSA1-1993) for ovine meat and positive control (meat) in the case of color, selecting the best combination of conservative (BE 400 AU / g / SL 0096 mL / g), (BE 400 AU / g / SP 5 mg / g) and (BE 100 AU / g / SN 0.5 mg / g).

Therefore, the bacteriocin produced by *E.faecalis* MXVK22 in combination with SL, SP, and SN can be used as natural antimicrobial agent, either alone or as part of a technology barriers.

On the other hand, to determine the shelf life of three meat products were evaluated quality parameters: microbiological analysis, pH, color and rancidity. The shelf life for Birria estimated at 25 ° C, Bb in the sample (taken from the bottom of the can) was 13 months, while for the trade sample was 56 months, with the limiting variable rancidity, it should be noted in the microbiological analysis at 37 ° C viable count was obtained only after three months of storage. The Shelf life at 4 ° C, ovine meat Burger (O) packaged with an oxygen-permeable film was 20 days, in modified atmosphere (AMO) was 21 days, with the variable limiting the viable count of mesophiles, unlike trademark (SK) which was 6 days, and in modified atmosphere (AMSK) was 8 days. The Shelf life at 4 ° C for marinated ovine meat was 11.3 days, and the trade marinated ovine meat was 11.8 days.

## INTRODUCCIÓN

El programa nacional pecuario señala que existe un aumento constante en la producción, el comercio y el consumo de carne. De acuerdo a las previsiones de organismos internacionales, esto se verá favorecido por el aumento demográfico y de los ingresos, exigiendo nuevas tecnologías y tendencias en el desarrollo de nuevos productos cárnicos (SAGARPA, 2007-2012). En la actualidad existe una marcada tendencia hacia los productos cárnicos frescos, mínimamente procesados, debido a que el consumidor lo asocia con beneficios a su salud. Existen varios factores que impactan tanto la calidad como la vida de anaquel de éstos productos, como son, temperatura, oxígeno del aire (O<sub>2</sub>), luz, humedad y carga microbiana (Zhou y col., 2010). Se han desarrollado métodos que elevan el nivel de inocuidad y prolongan la vida de anaquel de éstos productos, manteniendo los atributos de calidad, relevantes para el consumidor como son la inocuidad y las características sensoriales, nutricionales, y funcionales del producto cárnico (Vaudagna y col., 2006). Los aditivos alimentarios son clasificados por sus funciones principales en: conservadores, aditivos nutricionales, saborizantes, colorantes, texturizantes y auxiliares tecnológicos. A su vez, los conservadores se dividen en: antimicrobianos, antioxidantes y agentes antipardeamiento (Branen y col., 2002). La FDA define al antimicrobiano como una sustancia utilizada para conservar los alimentos, impidiendo el crecimiento de microorganismos y evitando de esta forma, el deterioro de los mismos. Los agentes antimicrobianos, pueden clasificarse dependiendo de su origen en: tradicionales, naturales, y químicos. La fuente de obtención de los antimicrobianos naturales puede ser microbiana, de plantas o animales (Davidson y col., 2005).

En particular, *Enterococcus faecalis* es una bacteria ácido láctica, que puede producir péptidos de bajo peso molecular (bacteriocinas), con actividad antimicrobiana, sintetizados ribosomalmente, con un gran potencial biopreservante contra bacterias patógenas y de deterioro (Brijesh y col., 2009). Son termoestables, reconocidas como sustancias seguras, ya que son inactivadas por proteasas gastrointestinales. La combinación de bacteriocinas con otros conservadores químicos, utilizados en la industria, puede ayudar a disminuir la adición de los mismos, así como también para aumentar la actividad inhibitoria contra bacterias Gram negativas (Sofos y col., 1998; Deegan y col., 2006; Gálvez y col., 2007; Brijesh y col., 2009).

## JUSTIFICACIÓN

La producción de carnes en México se sustenta en diferentes ramas de la ganadería, dentro de las cuales sobresalen la bovina, la porcina, y la avicultura, que en conjunto aportan el 98% de la producción nacional de cárnicos. El resto de las actividades destinadas a la producción de carne (producción ovina, caprina, conejos y la de pavos, entre otros) mantienen una posición marginal, situación principalmente influenciada por los hábitos de consumo de la población. Hay pocos estudios enfocados en la calidad e inocuidad de productos elaborados a partir de carne de ovino, ya que ésta se consume principalmente en forma de platillos tradicionales como barbacoa o mixiote que se consumen en el momento de su preparación. Con el tratado de libre comercio se abre un nuevo mercado potencial a diferentes grupos de consumidores de carne de ovino, por lo cual es importante buscar nuevos productos que tengan una amplia vida de anaquel.

La carne de ovino es un medio óptimo para el crecimiento de microorganismos por la gran cantidad de nutrientes que ésta contiene, por esto es importante la aplicación de métodos de conservación que logren prolongar la vida de anaquel de los productos elaborados con esta carne, evitando la descomposición de los mismos.

Por otro lado, las bacteriocinas son péptidos termoestables con actividad antimicrobiana que pueden conservar las características fisicoquímicas y sensoriales del producto en el que se emplean, y son considerados como conservadores naturales. En general, la utilización de estos conservadores naturales en alimentos está contemplada como parte de un mecanismo de barreras y no como agente de conservación único, por esto se debe realizar estudios para conocer con qué tipo de conservadores comerciales puede actuar mediante sinergismo, ampliando el espectro antimicrobiano de ambos conservadores. Obteniéndose productos de alto valor agregado debido a que son novedosos y con tecnología de barreras para aumentar su vida útil.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### *3.1 La carne y productos cárnicos*

La carne forma parte de la dieta humana desde la prehistoria, con el desarrollo de la humanidad, la producción de ganado se ha convertido en parte importante de la economía de los países en desarrollo. Sin embargo, en los últimos años, los requerimientos del consumidor ha cambiado, con la tendencia a adquirir productos cárnicos más saludables, por esta razón, la ciencia de la carne y productos cárnicos, se encuentra en desarrollo, necesitando unir los conocimientos de tres disciplinas básicas: la tecnología, la química y la microbiología. (Varnam, 1995).

### *3.2 Valor nutritivo de la carne de ovino*

La carne de ovino, es un producto que se consume preferentemente en alimentos tradicionales, como barbacoa, birria y mixiotes, la cual contiene una alta calidad nutritiva por su aporte de proteínas (18-20%), vitaminas como (tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantoténico, vitamina B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub>) y minerales como hierro y fósforo (Karabagias, 2011). Por otra parte, la carne de ovino tiene una mayor proporción de (ácidos grasos poliinsaturados/ácidos grasos saturados) (50 mg/100 g ácidos grasos) en comparación con la carne de res (38 mg/100 mg) y carne de cerdo (22 mg/100 mg), que es beneficioso para la salud ya que ayuda a controlar los niveles de colesterol en la sangre (Wood y col., 1999).

La carne, debido a su composición específica, y especialmente la carne de ovino, por su alto pH (en comparación con la de carne de cerdo), cuenta con excelentes condiciones para el crecimiento de bacterias de descomposición entre ellas: *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Enterobacteriaceae*, *B. thermosphacta*, *Aeromonas* (Bell, 2001).

### *3.3 Factores que determinan la calidad de la carne*

Los principales atributos de calidad de la carne son: suavidad, la jugosidad, el sabor, color y aroma. La cual depende de las condiciones *antemortem* del animal y del manejo *postmortem* de la canal, por lo que es necesario poner énfasis en el cuidado de estos puntos para asegurar la calidad de la misma (Pearson, 1994; Faustaman, 1994). Los

factores *premortem* más importantes son los genéticos, fisiológicos, nutricionales, de transporte y manejo adecuado anti estrés. Los factores *antemortem* más importantes son: el método de sacrificio (humanitario o no humanitario), higiene en el manejo y deshuese de la canal y la temperatura.

### ***3.4 Factores que influyen en la contaminación microbiana***

La muerte del animal no es la muerte de los órganos y los tejidos; los músculos y sus células, todavía vivos, sufren un conjunto importante de reacciones conocidas como rigidez cadavérica y maduración, en esta etapa los músculos se transforman en carne, existiendo factores que influyen en la contaminación microbiana.

La contaminación *antemortem* puede ser por animales enfermos, pero es poco probable, debido a que se elimina en una inspección sanitaria *ante* y *postmortem*. Sin embargo, existen animales aparentemente sanos, que albergan en su intestino grandes cantidades de gérmenes patógenos, en especial *Salmonellas* que pasan al músculo por ciertos traumatismos, accidentes o condiciones inadecuadas de sacrificio.

La contaminación *postmortem*, se sucede durante el sacrificio y a lo largo de la preparación de las canales, por el ambiente: materias fecales, piel, instrumental y manipuladores.

El músculo contiene todos los nutrientes necesarios para los microorganismos; sin embargo sus nutrientes son directamente accesibles por las barreras que es necesario franquear previamente (paredes celulares, tejido conjuntivo), por lo que la penetración de los microorganismos en la carne, en las canales o en piezas gruesas es por tanto lenta, mientras que para las carnes despiezadas o picadas es más rápida, existen factores que aceleran el crecimiento de microorganismos los cuales se mencionan a continuación (Bourgeois, y col., 1994).

#### ***3.4.1 Factores intrínsecos***

Los factores intrínsecos, son de naturaleza principalmente fisicoquímica relacionados a la composición de la carne. A continuación se muestran los principales factores que afectan el desarrollo y supervivencia de los microorganismos en la carne (Masana y col., 2006)

- ◆ pH
- ◆ Actividad de agua ( $A_w$ )
- ◆ Potencial Redox
- ◆ Nutrientes
- ◆ Viscosidad
- ◆ Microestructura
- ◆ Antimicrobianos naturales

Los factores intrínsecos más importantes son: la actividad de agua ( $A_w$ ), pH, potencial de óxido reducción, ya que influyen en el crecimiento de los microorganismos y afectan la conservación de la carne. La necesidad acuosa de los microorganismos se expresa relativamente en términos de actividad de agua ( $A_w$ ). La carne fresca tiene una ( $A_w$ ). La carne fresca tiene un  $A_w$  aproximada de 0.99, siendo este valor óptimo para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos. Si ( $A_w$ ) se reduce a 0.91 se verán inhibidas la mayoría de las bacterias, sin embargo los mohos y levaduras crecen a una ( $A_w$ ) de 0.80 o menor (Badui, 1999).

El pH óptimo para el crecimiento de los microorganismos varía dependiendo del tipo de microorganismo, se encuentran los acidófilos  $pH \leq 2-3$ , los neutrófilos  $pH=7$ , alcalófilos  $pH \geq 9$  y alcalófilos extremos  $pH \geq 12$ . Los valores de pH normales de la carne fresca son aproximadamente de entre (5.4 a 5.6), el pH, en el que se favorece el desarrollo de mohos y levaduras.

El potencial oxido-reducción de la carne constituye una indicación de su capacidad oxidante y reductora. Para alcanzar un crecimiento óptimo, los microorganismos anaerobios, necesitan condiciones de reducción (ausencia de oxígeno). Mientras que los aerobios necesitan condiciones de oxidación (presencia de oxígeno), los microorganismos facultativos pueden crecer en cualquiera de estas dos condiciones (Frazier y col., 1993; Varnam, 1995).

### 3.4.2 Factores extrínsecos

Los factores extrínsecos se refieren a aquellos relacionados con las condiciones del ambiente en el que se almacenan la carne y los productos cárnicos (Masana y col., 2006).

- ◆ Temperatura de almacenamiento (refrigeración)
- ◆ Atmósfera gaseosa ambiental
- ◆ Humedad Ambiental
- ◆ Microorganismo (Fisiología)
- ◆ Flora natural (Competencia, sinergismo)

La temperatura a la cual se almacena la carne determina la velocidad, tipo y cantidad por unidad de flora microbiana contaminante. Para inhibir el crecimiento microbiano, después de la muerte del animal, es conveniente reducir la temperatura muscular. Sin embargo, si ésta reducción es excesivamente rápida, no alcanzándose aún la resolución del *rigor mortis*, se tendrá un acortamiento muscular por frío, lo que reduce la calidad de la carne.

La humedad relativa es necesaria para mantener las condiciones óptimas de almacenamiento, y esta varía con la temperatura. A temperaturas de refrigeración, la humedad relativa debe oscilar aproximadamente entre (88 y 92%). Si la humedad relativa es baja, la humedad de la carne se perderá en la atmosfera y la carne presentará deshidratación superficial, pero si es demasiado alta, se va a dar una condensación sobre la superficie de la carne, humedeciéndose y convirtiéndose en un medio óptimo para el desarrollo microbiano (Wong, 1994).

### 3.5 Microbiología de la carne refrigerada

En condiciones de refrigeración se desarrollan principalmente microorganismos psicrófilos. En las cámaras de refrigeración que no tienen una limpieza eficiente, los principales géneros que proliferan son: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moroxella*. Donde las *Pseudomonas* es el género dominante, por lo que se le considera como el típico germen de la carne refrigerada. Estos microorganismos son Gram negativos, aerobios estrictos, capaces de crecer a temperaturas cercanas a 0°C. Otros microorganismos que pueden crecer sobre la superficie de la carne fresca, pertenecen a los géneros: *Lactobacillus*,

*Micrococcus*, *Aeromonas* y algunos de la familia *Enterobacteriaceae* como *Proteus* y *Flavobacterium* (Frazier y col., 1993; Bourgeois y col., 1994).

### ***3.6 Microbiología de la carne congelada***

Los procesos microbianos se suspenden por completo a temperaturas inferiores de (-18°C), no obstante la escarcha formada sobre la superficie de la carne, puede fundirse al mínimo incremento de temperatura, provocando un aumento en la  $A_w$ , favoreciéndose el crecimiento de microorganismos psicrófilos capaces de crecer en carne congelada. El límite inferior para éstas bacterias, es de (-5 a -7) °C. De los ejemplos de hongos que se producen en temperaturas de congelación se encuentra: *Clodosporium herbarum*, responsable de las conocidas manchas negras que aparecen en la carne congelada (Varnam, 1995).

### ***3.7 Microbiología de la carne empacada***

Las carnes frescas se conservan mejor, si se empacan con película impermeable al oxígeno, otro empaque es al vacío que contribuye a disminuir el desarrollo de microorganismos aeróbicos, sobre todo el de los mohos. Las carnes empacadas al vacío y almacenadas por tiempos prolongados en refrigeración, presentan contaminación microbiana con los microorganismos predominantes como: *Lactobacilos* y *B. thermosphacta* (Frazier y col., 1993).

### ***3.8 Microbiología de la carne enlatada***

Las carnes enlatadas muestran dos tipos de alteración: reblandecimiento y agriado por especies de *Bacillus* (*B. coagulana*, *B. cereus*, *B. subtilis*). La putrefacción, producción de gas y abombamiento de las latas, por crecimiento de *Clostridium sporogenes*. La producción de gas también puede ser ocasionada por bacterias como *Leuconostoc* pero solo cuando el tratamiento térmico ha sido inadecuado (Varnam, 1995).

### **3.9 Aditivos**

Un aditivo alimentario es una sustancia, o mezcla de sustancias, distinta a la materia prima básica del alimento, que se encuentra en éste como resultado de cualquier fase de producción, tratamiento, almacenamiento o envasado (Frazier y col., 1993).

Los aditivos alimentarios son clasificados por sus funciones principales en: conservadores, aditivos nutricionales, saborizantes, colorantes, texturizantes y auxiliares tecnológicos. Los conservadores se dividen en: antimicrobianos, antioxidantes y agentes antipardeamiento (Branen y col., 2002). La FDA (Food & Drugs Administration) define al antimicrobiano como sustancia utilizada para conservar los alimentos, impidiendo el crecimiento de microorganismos y evitando de esta forma, el deterioro de los mismos. Los agentes antimicrobianos, pueden clasificarse dependiendo de su origen en: tradicionales, naturales, y químicos. La fuente de obtención de los antimicrobianos naturales puede ser microbiana, de plantas o animales (Davidson y col., 2005).

#### **3.9.1 Conservadores**

La FDA define a un conservador químico como: cualquier sustancia química que, cuando se añade a un alimento, contribuye a evitar o retardar la alteración del mismo; aunque no incluye la sal común, los azúcares, los vinagres, las especias, los aceites extraídos de las especias y las sustancias añadidas por el humo de la madera.

##### **3.9.1.1 Acido sorbico y sorbatos**

El ácido sórbico ( $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCH}=\text{CHCOOH}$ ) y sus sales de sodio y de potasio, se usan para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras, en los alimentos con un pH hasta de 6.5, su efectividad aumenta al reducir el pH. El sorbato de potasio es la sal más usada porque se le ha encontrado un gran número de aplicaciones en diferentes alimentos y en distintas condiciones. Se ha demostrado que controla el crecimiento de *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Clostridium botulinum*. Por esta razón los sorbatos se han sugerido como sustitutos de los nitritos y los nitratos que se usan en la curación de los derivados cárnicos, como salchichas, jamones, etc. También han empleado soluciones al 5% para rociar o sumergir piezas de distintos tipos de carne, con lo cual se les

prolonga su vida de anaquel. Además, esta acción se mejora cuando se emplea en combinación con ácidos, tales como el fórmico, el cítrico o el láctico.

La acción de este ácido como conservador se basa en que tiene la propiedad de unirse a la superficie de las células microbianas, modificando la permeabilidad de la membrana y el metabolismo, pero también se ha sugerido que su estructura de dieno interfiere con el sistema enzimático de las deshidrogenasas de los microorganismos.

Existen otros ácidos grasos con insaturaciones en el carbono, que ejercen acciones semejantes; igualmente se considera que el ácido sórbico está sujeto a reacciones de oxidación debido a su insaturación, lo que produce radicales libres que atacan la membrana de la célula e inducen reacciones secundarias que inhiben el crecimiento microbiano (Badui, 1999).

### **3.9.1.2 Nitrito y nitratos**

Los nitritos y nitratos, además de desarrollar el color, olor y sabor característicos de la carne curada, penetran en la carne y proporcionan un ambiente menos favorable para el desarrollo de los microorganismos (Guerrero y col., 2002). Su función como conservador es muy específica en cuanto a que inhibe el crecimiento de *Clostridium botulinum*, microorganismo anaerobio altamente peligroso por las potentes neurotóxicas que sintetiza, que cuando se consumen producen un alto grado de mortalidad. Su efecto antimicrobiano se ve favorecido si, por su naturaleza de ácido débil, son más efectivos a pH ligeramente ácidos 5.0 a 5.5, en caso de que el pH sea superior, la concentración que normalmente se emplea en cárnicos (200 ppm de nitritos y 500 ppm de nitratos) será insuficiente; por el efecto sinérgico que se presenta cuando se mezcla con el cloruro de sodio, y al igual que sucede con cualquier otro alimento, las temperaturas bajas de almacenamiento contribuyen al control microbiológico, consecuentemente, a la eficiencia de los nitritos.

Su mecanismo de acción como conservador no se conoce totalmente, pero existen diversas teorías al respecto. Se sabe que los nitritos forman sustancias tóxicas para los microorganismos cuando reaccionan con los grupos sulfhidrilo de las proteínas o con algunos monofenoles como la tirosina, de donde se derivan compuestos nitrados monoaminodisustituidos.

El principal inconveniente que tiene el empleo de estos productos es que reaccionan con diferentes aminas secundarias y terciarias, produciendo nitrosaminas, que son agentes capaces de provocar cáncer en el hombre. Las aminas primarias no tienen importancia desde el punto de vista de la toxicidad, ya que generan monoalquilnitrosaminas, que son sustancias muy inestables, que se descomponen rápidamente en un alcohol y un alqueno (Badui, 1999).

### **3.9.1.3 Ácido láctico y lactato**

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

El lactato de sodio es una sal altamente higroscópica con un sabor ligeramente salino. Se utiliza como potenciador del sabor, emulgente, antioxidante, humectante y como conservador. No afecta negativamente el color de la carne. Aplicado en carne fresca, el lactato contribuye a conservar el color rojo del producto cárnico (Koos, 1992; Houtsma, 1996). El Lactato-sodio actúa como bacteriostático mediante el incremento de la fase latente (lag) de los microorganismos y agentes patógenos. El estudio del mecanismo acción específica del lactato indica que interfiere con el metabolismo de las bacterias, como la acidificación intercelular, la transferencia de protones a través de la membrana celular y las reacciones de inhibición. Igualmente, el lactato también reduce la actividad de agua, ésta acción antimicrobiana suprime el crecimiento durante largos periodos de tiempo, garantizando una mayor vida útil y el aumento de la seguridad del producto.

### **3.10 Bacteriocinas de las bacterias lácticas**

Las bacterias ácido lácticas (BAL), productoras de bacteriocinas se encuentran en los géneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* y *Pediococcus*, entre otros, las cuales han sido usadas en fermentaciones para preservar las cualidades nutritivas

de productos lácticos y cárnicos. Los productos principales de la fermentación de éstas bacterias, se encuentra el ácido láctico, peróxido de hidrogeno, diacetilo, acetoína, otros ácidos orgánicos y las bacteriocinas, que pueden actuar como bioconservantes, inhibiendo microorganismos de deterioro alimentario, además de otorgar un olor y sabor característico (O'Keefe y col., 1999; Holtzel y col., 2000; Magnusson y col., 2001).

Las bacteriocinas son péptidos bioactivos, sintetizados por BAL, durante la fase de crecimiento exponencial, y cuentan con un amplio espectro de inhibición contra bacterias patógenas y de deterioro. El uso de las bacteriocinas en la industria cárnica, puede ayudar a reducir la adición de conservadores químicos, además de minimizar la aplicación de tratamientos térmicos severos, asegurando la calidad del producto, mejorando la preservación de los nutrimentos y las vitaminas de los alimentos.

### ***3.10.1 Características de las bacteriocinas***

Las bacteriocinas son péptidos de bajo peso molecular (3.5 -5 KDa), que contienen entre 20 a 60 aminoácidos, pueden presentar estructuras  $\alpha$ -hélice y  $\beta$ -plegada, son sintetizados ribosomalmente por BAL, liberados extracelularmente, que pueden tener un efecto bactericida o bacteriostático, son reconocidas como seguras, ya que son inactivadas por proteasas gastrointestinales, son termoestables, y pH tolerantes (Ray y col., 2001; Galvez, y col., 2007).

### ***3.10.2 Modo de acción e las bacteriocinas***

El espectro de inhibición de las bacteriocinas es mayor a pH bajos y está dirigido a bacterias Gran positivas sin embargo se ha reportado actividad inhibitoria contra microorganismos patógenos, cuando se ha combinado con conservadores químicos o ácidos orgánicos. El modo de acción más reportado, es por medio de la desestabilización de las funciones de la membrana citoplasmática, formando poros en la misma, las bacteriocinas son moléculas cargadas positivamente, que poseen partes hidrofóbicas, que pueden establecer interacciones con los grupos fosfato de la membrana celular, los cuales están cargados negativamente (Chen y col., 1997; Lins y col., 1999; Cleveland y col., 2001).

### ***3.11 Vida de anaquel de productos cárnicos***

La vida útil o caducidad de un producto cárnico se define como el periodo de tiempo después de la elaboración, bajo determinadas condiciones de almacenamiento, en que el producto, sigue siendo seguro y apropiado para su consumo (Labuza, 1994; Man, 2004), conservando sus características nutricionales, funcionales y sensoriales.

#### ***3.11.1 Métodos para prolongar la vida útil***

De los métodos más importantes para prolongar la vida útil de los alimentos se encuentra la tecnologías de barreras (también llamada tecnología de obstáculos, métodos combinados, procesos combinados, conservación por combinación, técnicas combinadas o conservación multiblancos), cuyo fin es, conservar los alimentos mediante la aplicación de la combinación de varios factores de estrés, que no puedan ser superados por los microorganismos presentes, ésta combinación de los tratamientos asegura la estabilidad, inocuidad y calidad de los alimentos, es un método muy efectivo para vencer las respuestas homeostáticas microbianas y al mismo tiempo retener las características nutricionales sensoriales deseadas (Leitsner y col., 2002).

La biopreservación o bioconservación es un método de conservación que busca alargar la vida útil de los alimentos usando BAL y sus metabolitos. Los métodos de bioconservación más comúnmente utilizados en alimentos son la aplicación de cepas productoras de sustancias antagónicas, en forma de extracto crudo, licor fermentado o concentrados (obtenidos mediante el crecimiento de cepas biopreservantes en medios de cultivo específico) y la adición de sustancias antagónicas puras o semipuras como las bacteriocinas (Chen, y col., 2003).

### 3.11.2 Método para estimación de vida útil

En la mayoría de los estudios para estimar la vida útil, se han utilizado modelos dependientes de la temperatura, como el modelo de Arrhenius, no obstante en la mayoría de los alimentos la temperatura es el principal factor que afecta la vida útil, no es la única variable. (Elinarsson, y col., 1986; Gill y col., 1988; Gill y col., 1992)

Las aproximaciones modernas de la Microbiología Predictiva de alimentos, han tratado de entender y establecer un vínculo entre el crecimiento de microorganismos y los factores que regulan el crecimiento tales como: temperatura, pH, actividad de agua, potencial redox, ente otros. La gran mayoría de los modelos secundarios son modelos de tipo cinético (Labuza, y col., 1993; McDonald y col., 1999) de los cuales el más utilizado ha sido el modelo de Arrhenius. Donde la temperatura, es considerada como el factor más importante en las reacciones de deterioro de los alimentos, especialmente, para la alteración microbiana, donde la velocidad de crecimiento específico y la fase de latencia son altamente dependientes de la temperatura. La ecuación de Arrhenius fue derivada empíricamente basada en consideraciones termodinámicas y describe la velocidad con que una reacción cambia cuando se emplean diferentes temperaturas conocidas. La forma más simple de esta ecuación es:

$$k = Ae^{-Ea/RT}$$

ó

$$\ln k = \ln A - \frac{Ea}{RT}$$

Donde,  $k$  es la velocidad de reacción;  $A$  [ufc/ml, g o cm<sup>2</sup>)/tiempo] es un factor pre-exponencial parámetro a ser determinado (intercepto de “y” en una gráfica de  $\ln k$  vs  $1/T$ ),  $R$  es la constante de los gases ideales (8.314 KJ/kg°Kmol),  $T$  es temperatura absoluta (°K) y  $Ea$  (KJ/Kg mol) es denominada como energía de activación de la reacción. Si en la ecuación anterior los valores de  $k$  son calculados a diferentes temperaturas y si el  $\ln k$  es graficado contra  $1/T$ , puede obtenerse la ecuación recta tangente donde la pendiente ( $m$ ) es igual a  $(-Ea/R)$ . (Labuza y col., 1982; Qhiting y col., 1993; Ross y col., 1994; Giannuzzi y

col. 1998; McDonald y col., 1999). Cuando el modelo de Arrhenius es empleado para evaluar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento microbiano, entonces  $k$  se transforma en la velocidad de crecimiento específico.

### ***3.11.2.1 Vida útil microbiológica***

Los alimentos perecederos son aquellos de tipo o condición tales que pueden deteriorarse, como los alimentos compuestos total o parcialmente de leche, productos lácteos, huevo, carne, aves de corral, pescado o mariscos, o de ingredientes que permitan el crecimiento progresivo de microorganismos que puedan ocasionar envenenamiento u otras enfermedades transmitidas por alimentos. Aquellos alimentos que son considerados como perecederos generalmente poseen una vida útil de 7 días, y esta vida útil está limitada en la mayoría de los casos por el decaimiento bioquímico o microbiológico (Labuza, 1994).

### ***3.11.3 Parámetros de calidad de la carne***

#### ***3.11.3.1 pH***

En el músculo del animal vivo, el pH se encuentra cerca de 7, y con la muerte, por la falta de oxígeno se activa la glucólisis anaerobia produciendo ácido láctico que provoca el descenso del pH muscular hasta un valor promedio de 5.5 (Lawrie, 1982).

Con un pH 5.4 a 5.6 en la carne hay proliferación mínima de gérmenes; por lo tanto, su vida de almacén es mayor, además permite una penetración más rápida de los ingredientes usados para su curación en el tanque tradicional de salmuera o por los métodos con sal seca. El pH alto inhibe las enzimas endógenas y la carne no madura, permaneciendo dura y oscura, con mayor crecimiento microbiano y presenta dificultad para la penetración de las sales de curado (Chorné y col., 1996; Garipey y cols., 1997).

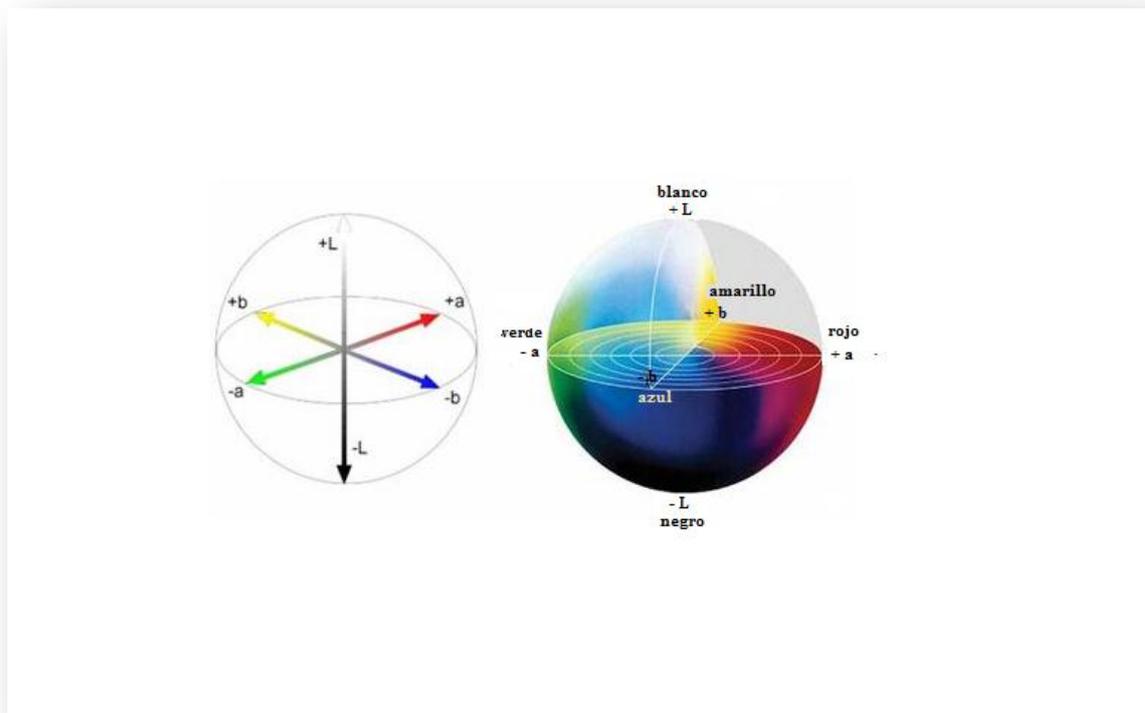
#### ***3.11.3.2 Color***

La estabilidad del color es uno de los atributos más importantes de la calidad que indicando una carne en buen estado. El color de la carne y de los productos cárnicos se

puede alterar por distintos factores como la exposición a la luz (tipo de fuente luminosa e intensidad), crecimiento microbiano, rancidez y exposición al oxígeno, entre otros.

La CIE (Commission Internationale de l'Éclairage, 1976) desarrolló el sistema más utilizado para la determinación de color, siendo, el espacio de color CIELAB. Es un sistema tridimensional esférico definido por tres coordenadas colorimétricas,  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  (Warriss, 1995). Son magnitudes adimensionales y se calculan a partir de fórmulas matemáticas.

En la figura 1 se aprecian éstas coordenadas y los colores que toman, la coordenada  $L^*$  recibe el nombre de claridad o luminosidad, y puede tomar valores entre 0 y 100. Las coordenadas colorimétricas  $a^*$  y  $b^*$ , forman un plano perpendicular a la luminosidad. La coordenada  $a^*$  define la desviación del punto acromático correspondiente a la luminosidad, hacia el rojo si  $a^*$  es positiva y hacia el verde si  $a^*$  es negativa.



**Figura 1**Componentes del color:  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ .

Análogamente, la coordenada  $b^*$  define la desviación hacia el amarillo si  $b^*$  es positiva y hacia el azul si  $b^*$  es negativa (Gilabert, 1992).

Existen dos magnitudes colorimétricas, las cuales podemos observar en la figura 2, también llamadas magnitudes psicofísicas, el tono ( $h^\circ$ ) y el croma (C), calculadas a través de fórmulas matemáticas a partir de  $a^*$  y  $b^*$  (Álvarez y col., 1999).

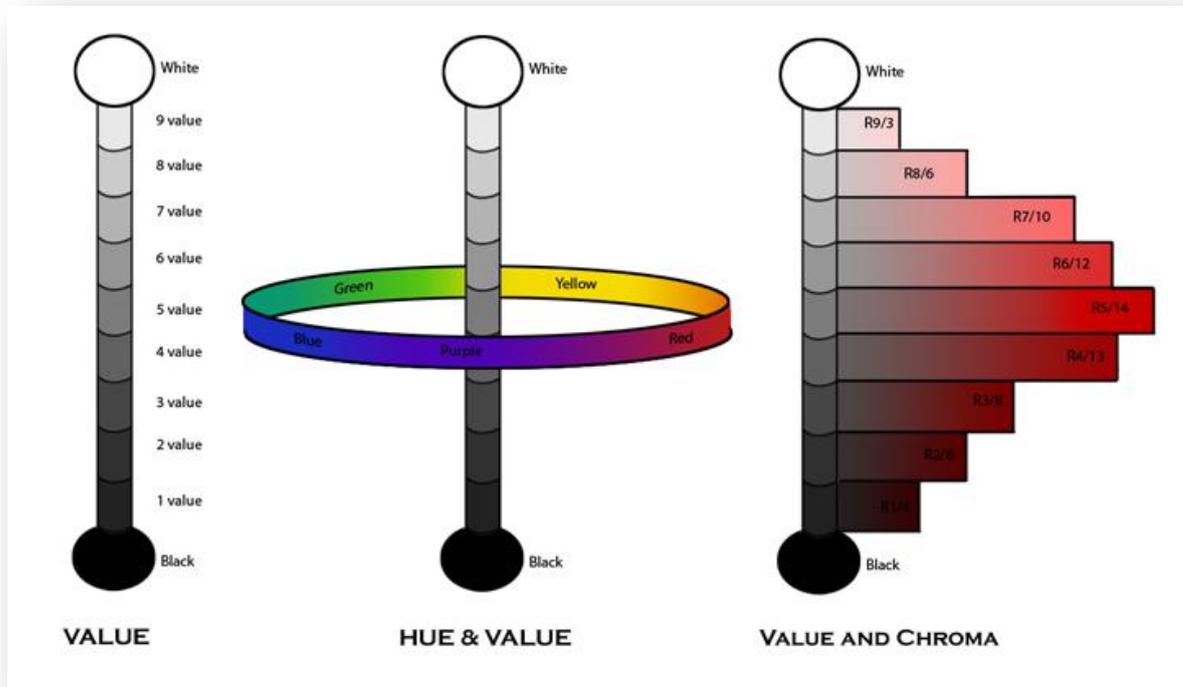


Figura 2. Las magnitudes colorimétricas, el tono ( $h^\circ$ ) y el croma (C).

### 3.11.3.3 Rancidez

El deterioro de las carnes rojas se evalúa por la rancidez de las grasas (debida a la autooxidación de los lípidos que la componen) y por la acidificación (debida a la proliferación de bacterias productoras de ácidos láctico y acético). La oxidación de los alimentos ricos en grasas disminuye notablemente la calidad de los mismos. Esta reacción química tiene varios procesos, de manera que la medida química, sólo es un estimado de las reacciones totales que ocurren. La oxidación es causada por la reacción del oxígeno atmosférico con las dobles ligaduras de las grasas insaturadas, y es catalizada por luz, humedad, calor y metales que se encuentran como contaminantes en las sales (Guerrero, y col., 2002). Las grasas animales, un componente importante en el sabor de la carne, están

compuestas en mayor proporción por ácidos grasos de la cadena larga, como son: el ácido oleico ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ ), el ácido linoleico ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ ) y el ácido linolénico ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ ) (Price, y col., 1994).

El procesamiento de alimentos cárnicos libera hierro de la hemoglobina, el cual es un prooxidante muy potente, causando rancidez. Esta reacción es más probable que ocurra en productos cárnicos, debido a que han sido mezclados con otros ingredientes que promueven la formación de radicales libres, como sales contaminadas con metales, o por su exposición a condiciones que favorecen esta reacción.

La determinación de rancidez se basa en conocer la cantidad de productos intermediarios o finales de la reacción. Los dos métodos más comunes para determinar la rancidez en carnes son el de TBA (ácido 2-tiobarbitúrico) y el valor de peróxido. En ambos casos, el valor que determina la rancidez es arbitrario.

La oxidación de grasas produce aldehídos, responsable de los sabores desagradables de los productos cárnicos rancios. El malonaldehído es usado como un indicador de esta rancidez, y se evalúa a través de la reacción con ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). El método se basa en la reacción de condensación entre dos moléculas de TBA y una de malonaldehído, proceso que forma un compuesto cromógeno de color rosa cuya concentración se puede determinar espectrofotométricamente a 530nm (Guerrero, y col., 2002).

## HIPÓTESIS

Si la bacteriocina producida por *Enterococcus faecalis* MXVK22 presentará un efecto sinérgico con alguno de los conservadores tradicionales, lo que podría llevar a una disminución en la concentración necesaria para asegurar la vida de anaquel.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antimicrobiano de sorbato de potasio, nitrito de sodio y lactato de sodio en combinación con la enterocina producida por *Enterococcus faecalis*MXVK2, sobre la vida de anaquel de un producto a base de carne molida de ovino.

### 5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Extraer la bacteriocina producida por *Enterococcus faecalis* MXVK22.
- II. Evaluar el efecto antimicrobiano de la combinación de conservadores (sorbato de potasio, nitrito de sodio y lactato de sodio) con la bacteriocina en carne molida de ovino.
- III. Determinar el efecto de la vida de anaquel de productos cárnicos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El proyecto se estructuró en dos fases, la primera fase se refiere a la extracción y determinación de la actividad inhibitoria de la bacteriocina producida por *Enterococcus faecalis* MXVK22, así como la evaluación de las combinaciones de la bacteriocina con los antimicrobianos, conforme a un arreglo de ajedrez. En la segunda fase, se determinó la vida de anaquel de tres productos cárnicos. En la figura 3 se muestra el esquema general de trabajo.

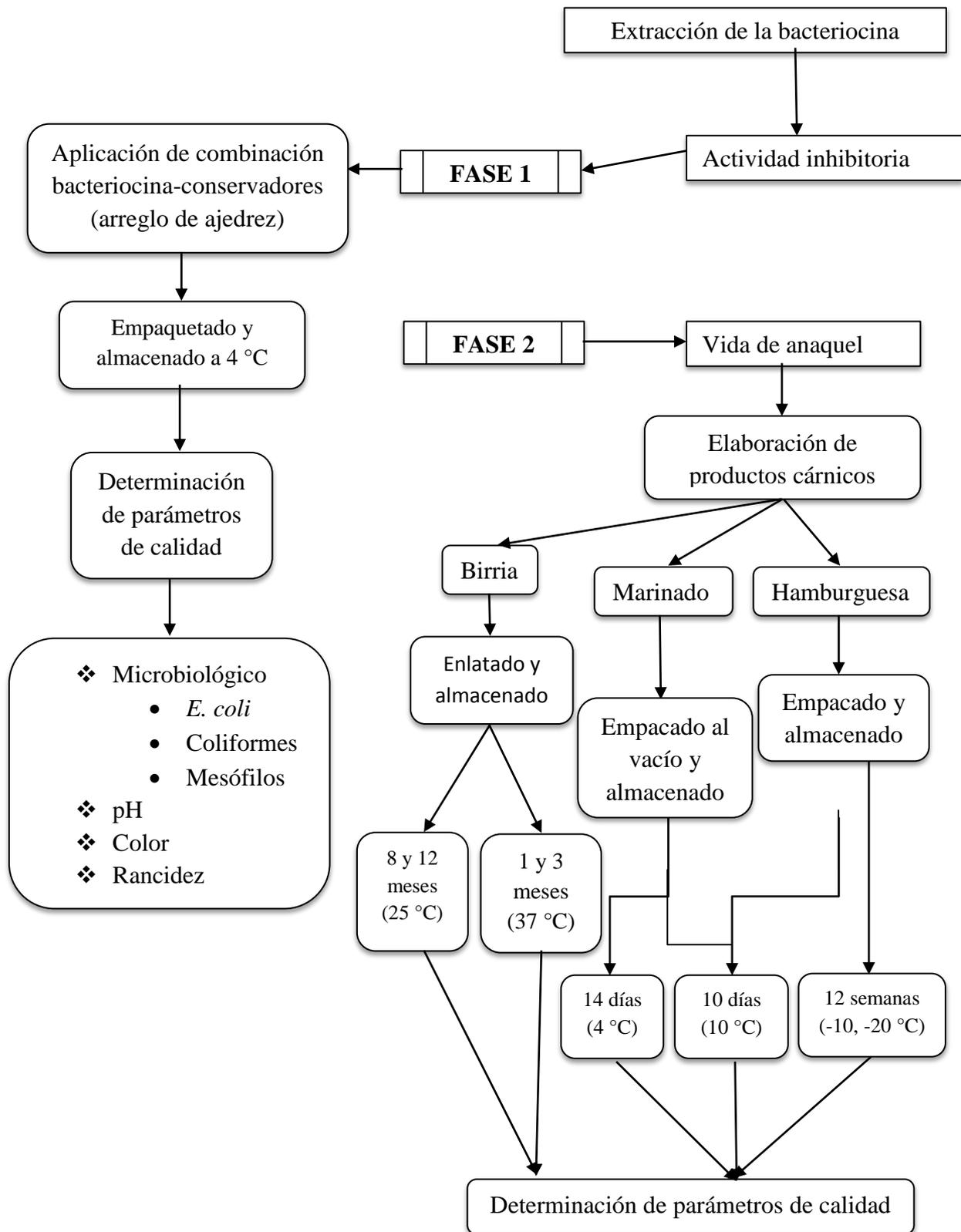


Figura 3. Diagrama de flujo

## 6.1 Fase 1

### 6.1.1 Activación y crecimiento de microorganismos

Las cepas utilizadas en este estudio (*Enterococcus faecalis* MXVK22 y *Escherichia coli* JMP 101) fueron donada por el Dr. M. Collins Queen's University of Belfast, Irlanda. La activación de *E. coli* JMP 101 se realizó en caldo soya tripticaseína (TSB). *Enterococcus faecalis* MXVK22 se cultivó en caldo glucosa caseína (CCG, Anexo1).

### 6.1.2 Extracción de la bacteriocina

El extracto de bacteriocina (EB), se obtuvo a partir de un cultivo de *E. faecalis* MXVK22 de 16 horas en condiciones anaerobias. Posteriormente se sometió a un tratamiento térmico a 70 °C durante 30 minutos, para la inactivación de las proteasas presentes en el medio (Katla, y col., 2003). Seguido de centrifugación a 3100 x g durante 20 minutos a 4 °C, el sobrenadante se ajustó a un pH 6.5 y se liofilizó. El liofilizado se etiquetó como EB y se almacenó a -80°C en un ultracongelador Revco modelo ULTI386-7-AI14 (Revco, Acheville, E.U.A.) hasta su uso.

### 6.1.3 Actividad inhibitoria de la bacteriocina

El EB se disolvió en agua estéril a una concentración de 500 mg/mL y se esterilizó por filtración, utilizando membranas estériles Millipore de 0.45 µm (Durapore® MembraneFilters, GV, Irlanda). Posteriormente se realizaron diluciones seriadas de 2 en 2 y se almacenaron en refrigeración hasta su uso. La actividad inhibitoria se llevó a cabo por el método de difusión en placas de agar (Schillinger y Lücke, 1989), con modificaciones, utilizando *Listeria innocua* ATC33090 como cepa sensible. La técnica consistió en depositar 30 µL de las diluciones seriadas de EB, en pozos hechos con una pipeta pasteur estéril, en un medio semisólido (0.8% de agar bacteriológico), de TSB, el cual fue previamente inoculado con 70µL de un cultivo en fase logarítmica  $10^6$ - $10^7$  ufc/mL (D.O 600nm = 0.3) de la cepa sensible, sobre una capa de medio sólido (1.5% de agar

bacteriológico) de TSB. La actividad del EB, se evaluó observando el halo de inhibición formado, una vez incubada la placa a 37°C durante 24 h, para el desarrollo de la cepa sensible. La actividad inhibitoria se reportó en unidades arbitrarias por mililitro (UA/mL) que se definen como: el inverso de la máxima dilución (base 2) a la cual se obtuvo un halo de inhibición de 2 mm de diámetro, entre el volumen del compuesto antimicrobiano colocado en cada pozo, por el factor de conversión (Bhunias, y col., 1991; Chikindas, y col., 2004).

#### **6.1.4. Pruebas de susceptibilidad microbiana**

Para la realización de las pruebas de susceptibilidad microbiana, primero se preparó el inóculo, después las diferentes concentraciones de los conservadores a ocupar, por último la carne.

##### **6.1.4.1 Preparación del inóculo**

Una vez activada la cepa *Escherichia coli* JMP 101, se comprobó la pureza de la misma mediante la siembra en placa con EAM (agar eosina azul de metileno), como medio selectivo para *Escherichia coli*. Para observar y comparar la morfología de crecimiento, se le realizó tinción de Gram, y la prueba de la catalasa (Anexo2). Se procedió entonces a hacer las conservas de las cepas que se almacenaron en viales con 50% de glicerol a -80 ° C hasta su uso.

Para preparar el inóculo se activó la cepa, en un tubo con TSB por 24 horas a 37 °C, después se realizó una siembra por estría en placa con AEM, con el objeto de aislar las colonias a utilizar. Se ocuparon de 3 a 5 colonias, las que se disolvieron una por una, en solución salina al 0.85%, posteriormente se realizó un ajuste de densidad óptica, con un blanco (# 5 de Mac Farland), para garantizar que se tenían  $5 \times 10^8$  UFC/ mL . Después se realizó una dilución 1:100 en solución salina  $5 \times 10^6$  UFC/mL, y finalmente se hizo una dilución 1:2 para obtener una concentración final de inóculo de  $5 \times 10^5$  UFC/mL.

#### **6.1.4.2 Preparación de los conservadores**

Para la preparación de los conservadores, se utilizaron los siguientes antimicrobianos: Nitrito sodio (NS) Industrias Alimenticias Fabp S.A. de C.V. D.F. México); sorbato de potasio (PS) Mc Cormick Pesa, S.A. de C.V. Estado de México, México, y lactato de sodio (LS) Purasal ®s, de Purac México, S. de R.I. de C.V. Houston, Texas). Las concentraciones de los conservadores, fueron seleccionadas de acuerdo a la NOM-213-SSA1-2002. Productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias que indica, que la suma de los conservadores no debe exceder los 1000 mg por kilogramo de carne, exceptuando el NS, ya que la concentración que marca la norma es 200 ppm. La concentración más alta de NS ocupada en este estudio fue de 0.5 mg/g que equivale a 500 ppm, debido a que el nitrito no inhibe a *E.coli* en las condiciones de pH establecidas en este ensayo, se empleó una concentración más alta, para garantizar encontrar al menos una combinación óptima de inhibición.

Se prepararon cuatro concentraciones del EB (50-400 UA/g), con los antimicrobianos: NS (0.0625-0.500 mg/g), SP (0.625-5 mg/g) y LS (0.096-0.77 mL/g) en agua estéril. Se mantuvieron en refrigeración para su uso inmediato.

#### **6.1.4.3 Preparación de las muestras de carne molida**

La preparación de la carne de ovino se realizó de la siguiente forma: primero se obtuvo la carne de ovino del rastro municipal de Nezahualcóyotl, ubicado en el Estado de México, los animales fueron sacrificados el mismo día que se adquirieron. La carne fue transportada en condiciones de refrigeración para su análisis, y se ocupó la pierna de la canal, se deshueso y se le retiró la grasa, posteriormente la carne se cortó en pedazos pequeños, para molerla en un molino Kitchen Aid Classic (modelo MK456PWH Michigan, U.S.A). Finalmente se pesaron porciones de 20 g de carne, cabe señalar que a la carne no se le agregó ningún aditivo para ver solo el efecto de la bacteriocina con los conservadores.

#### 6.1.4.4. Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana

Para el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana, se utilizó un arreglo de ajedrez, para evaluar las combinaciones de las diferentes concentraciones de BE con SP, NS y LS. Como se muestra en la tabla 1, 2 y 3. Las combinaciones se formaron con 5 mL de bacteriocina más 5 mL del conservador (SP, LS o NS). Estas combinaciones se adicionaron a la carne molida, inoculada previamente con 10 mL de inóculo con una carga microbiana de  $5 \times 10^5$  CFU/mL y de esta forma simular una contaminación extrema. Posteriormente la carne se mezcló y se moldeó en forma de hamburguesa, se empacó con película impermeable al oxígeno, en charolas de polietileno de alta densidad y después se almacenó por 9 días a 4 °C. Los días de muestreo fueron 0, 3, 6, y 9. Al control positivo (carne sola) no se le administró ningún antimicrobiano, ni inóculo y el control negativo fue la carne con inóculo y sin ningún antimicrobiano.

**Tabla 1. Arreglo de ajedrez del extracto de bacteriocina(50-400UA/g) y sorbato de potasio (0.625-5 mg/g).**

		<i>Sorbato de potasio (mg/g)</i> <i>[clave de combinación]</i>				
		0/0	0/0.625	0/1.25	0/2.5	0/5
<i>Extracto de bacteriocina (UA/g)</i>	[111]	[112]	[113]	[114]	[115]	
	50/0	50/0.625	50/1.25	50/2.5	50/5	
	[121]	[122]	[123]	[124]	[125]	
	100/0	100/0.625	100/1.25	100/2.5	100/5	
	[131]	[132]	[133]	[134]	[135]	
	200/0	200/0.625	200/1.25	200/2.5	200/5	
	[141]	[142]	[143]	[144]	[145]	
	400/0	400/0.625	400/1.25	400/2.5	400/5	
	[151]	[152]	[153]	[154]	[155]	

Tabla 2. Arreglo de ajedrez del extracto de bacteriocina(50-400UA/g) y lactato de sodio (0.096-0.77 mL/g).

		<i>Lactato de sodio (mL/g)</i> <i>[clave de combinación]</i>				
		0/0	0/0.096	0/0.19	0/0.38	0/0.77
<i>Extracto de bacteriocina (UA/g)</i>		0/0	0/0.096	0/0.19	0/0.38	0/0.77
		[211]	[212]	[213]	[214]	[215]
		50/0	50/0.096	50/0.19	50/0.38	50/0.77
		[221]	[222]	[223]	[224]	[225]
		100/0	100/0.096	100/0.19	100/0.38	100/0.77
		[231]	[232]	[233]	[234]	[235]
		200/0	200/0.096	200/0.19	200/0.38	200/0.77
		[241]	[242]	[243]	[244]	[245]
		400/0	400/0.096	400/0.19	400/0.38	400/0.77
		[251]	[252]	[253]	[254]	[255]

Tabla 3. Arreglo de ajedrez del extracto de bacteriocina(50-400UA/g) y nitrito de sodio (0.0625-0.5 mg/g).

		<i>Nitrito de sodio (mg/g)</i> <i>[clave de combinación]</i>				
		0/0	0/0.0625	0/0.125	0/0.25	0/0.5
<i>Extracto de bacteriocina (UA/g)</i>		0/0	0/0.0625	0/0.125	0/0.25	0/0.5
		[311]	[312]	[313]	[314]	[315]
		50/0	50/0.0625	50/0.125	50/0.25	50/0.5
		[321]	[322]	[323]	[324]	[325]
		100/0	100/0.0625	100/0.125	100/0.25	100/0.5
		[331]	[332]	[333]	[334]	[335]
		200/0	200/0.0625	200/0.125	200/0.25	200/0.5
		[341]	[342]	[343]	[344]	[345]
		400/0	400/0.0625	400/0.125	400/0.25	400/0.5
		[351]	[352]	[353]	[354]	[355]

### **6.1.5. Análisis estadístico de la Fase 1.**

Los datos obtenidos de las combinaciones de bacteriocina-conservador, fueron analizados estadísticamente empleando análisis de varianza (ANDEVA), utilizando un diseño factorial con  $k=2$  factores, con 4 (días de almacenamiento: 0, 3, 6, 9) y 5 niveles de prueba (concentración: 1, 2, 3, 4, 5), que forman el arreglo factorial de  $4 \times 5$ . Todas las variables que presentaron diferencia significativa con una  $p < 0.05$ , las cuales fueron analizadas por medio de la prueba de comparaciones múltiples de Turkey B, empleando el paquete estadístico SPSS 15.0 para Windows 2006.

Adicionalmente se obtuvieron los gráficos de las medias marginales estimadas para los niveles de factores y las interacciones de los factores, por variable respuesta. Todos los datos obtenidos, fueron analizados conforme a los parámetros de calidad reportados para carne de ovino y los datos obtenidos del control positivo, seleccionando las cinco mejores combinaciones por conservador.

## **6.2 Fase 2**

Para determinar la vida de anaquel de los productos cárnicos: birria de carne de ovino enlatada, fajitas marinadas de carne de ovino y hamburguesa de carne de ovino, primero se elaboraron los productos conforme a la formulación y a la normatividad, mostrada en el Anexo 3. La que se llevó a cabo en la planta piloto de tecnología de carnes de la UAM-Iztapalapa.

### **6.2.1 Determinación de la vida de anaquel de birria de carne de ovino enlatada**

La determinación de la vida de anaquel, se realizó de la siguiente manera, una vez elaboradas las latas de birria, se etiquetaron y almacenaron por ocho y doce meses a temperatura ambiente y por uno y tres meses a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , todas las latas se revisaron periódicamente (cada semana), durante todo el almacenamiento, con el objeto de encontrar alguna anomalía que se pudiera llegar a presentar en la lata. El último día de almacenamiento se procedió a realizar el análisis microbiológico, medición de pH y determinación de rancidez, del apartado 6.3, a las muestras de birria.

### **6.2.2 Determinación de vida de anaquel de fajitas marinadas de carne de cordero**

La elaboración de las fajitas marinadas de carne de ovino, se llevó a cabo mediante la selección la carne, enseguida, se le retiró la grasa, se redujo de tamaño y después los cortes de carnes, se sometieron a un proceso de masajeado al vacío con una mezcla de fosfatos, agua y especias, las muestras se empacaron vacío y se almacenaron a 4 ° C durante catorce días, los días de muestreo fueron 0, 2, 4, 6, 8, 10,12 y 14 y a 10 ° C durante diez días consecutivos. Por último se realizó el análisis microbiológico, medición de pH, color y determinación de rancidez del apartado 6.3, para determinar la vida de anaquel con los datos obtenidos.

### **6.2.3 Determinación de la vida de anaquel de hamburguesa de carne de ovino**

Se elaboró la hamburguesa conforme a la formulación establecida, se pesaron 90 g de carne, moldeándola en forma de hamburguesa, se empacaron con película impermeable al oxígeno y en atmósfera modificada compuesta por una fórmula de gases de 70% de N<sub>2</sub> y 30% CO<sub>2</sub> aproximadamente, de manera que el contenido de O<sub>2</sub> dentro del envase fuese inferior al 0.5%, se colocaron en charolas de polietileno de alta densidad, las cuales fueron almacenadas a 4 ° C durante catorce días, a 10 ° C durante diez días y a -10 y -20 ° C, por 12 semanas, el muestreo fue semanal.

## **6.3 Determinación de los parámetros de calidad**

### **6.3.1 Análisis microbiológico**

El análisis microbiológico se llevó a cabo por el método de “dilución en placa” de acuerdo a lo que marca NOM-092-SSA1-1994 método para la cuenta de bacterias aerobias en placa, NOM-113-SSA1-1994 para evaluación de *E.coli* JMP 101 y coliformes totales y NOM-034-SSA1-1993, Bienes y Servicios. Productos de la Carne Molida y Carne Molida Moldeada Envasada. Especificaciones sanitarias. Para la cuenta viable de mesófilos se

utilizó agar cuenta estándar (CE). Para la cuenta viable de coliformes se empleó Agar Bilis Rojo Violeta (ABRV). Para el crecimiento de microorganismos anaerobios que pudieran estar presentes en la lata, en el caso de la birra de cordero, se utilizó agar nutritivo, y las placas fueron colocadas en jarras especiales para vacío, para establecer condiciones de anaerobiosis. Se incubaron a 37 ° C durante 24 horas.

### 6.3.2 Medición de pH

La medición de pH se llevó a cabo con un potenciómetro, Beckman (modelo pH I Meter, U.S.A), la medición se hizo por cuadruplicado, insertando el electrodo en la carne.

### 6.3.3 Medición del color

La determinación de color se realizó empleando un colorímetro Hunter-Lab Color Flex (Spectrophotometer 45/0, Iluminante D65, 10°, puerto 19.1 mm, Hunter Associates Lab, Inc. Reston, USA), el equipo se calibró usando como estándar una cerámica color negra y blanca con los siguientes valores, La carne se cubrió con película impermeable al oxígeno, y se colocó sobre el puerto del colorímetro, las muestras se rotaron 90° y la lectura se hizo por cuadruplicado, se obtuvieron los valores de CIE L\*, a\* y b\*. Los parámetros a\* y b\* se transformaron a coordenadas polares, para obtener los valores de cromaticidad y tonalidad (Guerreo y col., 2000).

$$Tonalidad = \tan^{-1} \frac{b^*}{a^*} \qquad Cromaticidad = \sqrt{a^2 + b^2}$$

### 6.3.4 Determinación de Rancidez

El análisis de rancidez o detección de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA), se obtuvo del extracto de la carne, pesando 2.5g de carne, la cual se homogenizó con 25 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 5 % con un homogenizador IICA T18 basic OCTZA-TURRAX ® ULTRA (Stufen, Germany), posteriormente se centrifugó a 3100 x g durante 15 minutos a 4 ° C, en una centrifuga 2810R eppendorf AG (Hamburg, Germany),

el sobrenadante se filtró y se ajustó el volumen a 25 mL con TCA. Para la reacción con el TBA se ocupó una alícuota de un mL de extracto más un mL de TBA, el blanco llevo TBA más TCA. Los tubos se colocaron en baño maría a 90 ° C durante treinta minutos, enseguida se midió la absorbencia a 530 nm en un espectrofotómetro Varian 50 Bio (Australia).

## RESULTADOS

### 7.1 Fase 1

#### 7.1.1 Actividad Inhibitoria

La determinación de la actividad inhibitoria se llevó a cabo por duplicado, el extracto de bacteriocina producido por *Enterococcus faecalis* MVK22, presentó halos de inhibición hasta la dilución cuatro en la primera determinación y en la segunda hasta la dilución ocho. Dando una actividad de 400 UA/mg de extracto de bacteriocina, la cual se puede apreciar en la figura 4.

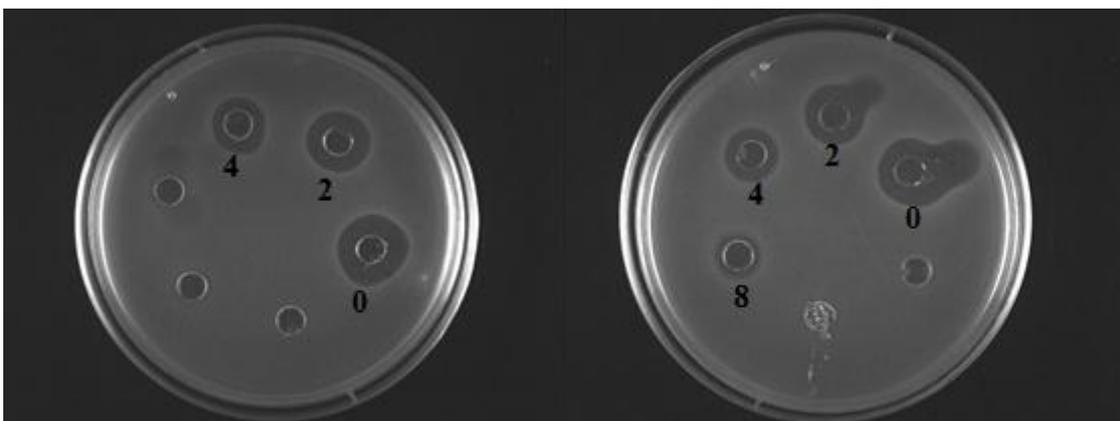


Figura 4. Actividad antimicrobiana del extracto de bacteriocina producido por *Enterococcus faecalis* MVK22.

### 7.1.2 Análisis estadístico.

De los resultados obtenidos en el primer estadístico (Anexo 4), se escogieron las cinco mejores combinaciones por conservador. Lo anterior con el fin de encontrar un efecto entre conservadores y la bacteriocina, para esto se empleó, un análisis de varianza (ANDEVA), utilizando un diseño factorial 4x5. La combinación consta de 3 números, como se pudo apreciar en las tablas 1, 2 y 3. El primer número fue para identificar al conservador, sorbato de potasio fue el 1, el lactato de sodio fue el 2 y nitrito de sodio fue el 3. El segundo número indicó la concentración de bacteriocina (1-5) y el último número señaló la concentración del conservador (1-5). Se marcó en negritas la mejor combinación por conservador, que fueron las que tuvieron más atributos de calidad de acuerdo a la norma NOM-034-SSA1-1993, a lo reportado para carne de ovino (Berruga 2005; Muela, 2010; Karabagias, 2011) y al control positivo (carne sola), para comparar el color. Conforme a las variables respuesta mostradas en la tabla 4. Para el sorbato de potasio es la combinación **155** (400UA/g bacteriocina – 5 mg/g sorbato de potasio), para el Lactato de sodio es **252**(400UA/g bacteriocina– 0.96 mL/g lactato de sodio), por último para nitrito de sodio es **335**(100UA/g bacteriocina – 0.5 mg/g nitrito de sodio).

Tabla 4. Comparación de combinaciones de las medias de Tukey B.

Mesófilos	E. coli	Coliformes	pH	L	a	b	Cromaticidad	Tonalidad	Conservador
<b>155<sup>d</sup></b>	<b>155<sup>de</sup></b>	115 <sup>e</sup>	115 <sup>e</sup>	145 <sup>c</sup>	153 <sup>h</sup>	123 <sup>d</sup>	<b>155<sup>g</sup></b>	<b>155<sup>f</sup></b>	
154 <sup>bc</sup>	143 <sup>b,c,d</sup>	121 <sup>b,c,d</sup>	114 <sup>c</sup>	<b>155<sup>b,c</sup></b>	<b>155<sup>g,h</sup></b>	132 <sup>c,d</sup>	153 <sup>g</sup>	153 <sup>e</sup>	
135 <sup>bc</sup>	134 <sup>bc</sup>	131 <sup>bc</sup>	141 <sup>bc</sup>	152 <sup>bc</sup>	115 <sup>de</sup>	145 <sup>c,d</sup>	114 <sup>de,f</sup>	152 <sup>c</sup>	<b>Sorbato</b>
123 <sup>a,b,c</sup>	142 <sup>ab</sup>	114 <sup>b</sup>	145 <sup>ab</sup>	153 <sup>bc</sup>	121 <sup>ab</sup>	134 <sup>b,c,d</sup>	131 <sup>bc</sup>	154 <sup>b</sup>	
132 <sup>ab</sup>	152 <sup>a</sup>	135 <sup>a</sup>	144 <sup>a</sup>	132 <sup>bc</sup>	131 <sup>a</sup>	124 <sup>bc</sup>	121 <sup>bc</sup>	132 <sup>a</sup>	
235 <sup>f</sup>	255 <sup>g</sup>	255 <sup>g</sup>	<b>252<sup>d</sup></b>	255 <sup>bc</sup>	<b>252<sup>g,h</sup></b>	224 <sup>e</sup>	232 <sup>g</sup>	255 <sup>h</sup>	
255 <sup>f</sup>	235 <sup>f</sup>	253 <sup>g</sup>	243 <sup>d</sup>	251 <sup>ab</sup>	234 <sup>f,g,h</sup>	255 <sup>e</sup>	<b>252<sup>g</sup></b>	235 <sup>g</sup>	
253 <sup>e</sup>	<b>252<sup>f</sup></b>	243 <sup>g</sup>	253 <sup>d</sup>	241 <sup>ab</sup>	222 <sup>f,g</sup>	225 <sup>c,d</sup>	253 <sup>f</sup>	243 <sup>f</sup>	<b>Lactato</b>
243 <sup>e</sup>	253 <sup>f</sup>	235 <sup>g</sup>	232 <sup>d</sup>	235 <sup>ab</sup>	223 <sup>de</sup>	234 <sup>c,d</sup>	243 <sup>ef</sup>	<b>252<sup>f</sup></b>	
<b>252<sup>e</sup></b>	243 <sup>f</sup>	<b>252<sup>f</sup></b>	255 <sup>bc</sup>	221 <sup>a</sup>	243 <sup>de</sup>	235 <sup>b,c,d</sup>	223 <sup>ef</sup>	253 <sup>d</sup>	
324 <sup>c,d</sup>	334 <sup>e</sup>	322 <sup>e</sup>	315 <sup>d</sup>	355 <sup>bc</sup>	322 <sup>ef</sup>	351 <sup>b</sup>	323 <sup>c,d,e</sup>	334 <sup>k</sup>	
325 <sup>bc</sup>	<b>335<sup>de</sup></b>	<b>335<sup>e</sup></b>	311 <sup>c</sup>	312 <sup>bc</sup>	323 <sup>de</sup>	352 <sup>a</sup>	324 <sup>b,c,d</sup>	344 <sup>j</sup>	
334 <sup>ab</sup>	323 <sup>de</sup>	334 <sup>e</sup>	341 <sup>bc</sup>	351 <sup>ab</sup>	325 <sup>c,d</sup>	353 <sup>a</sup>	<b>335<sup>b</sup></b>	<b>335<sup>i</sup></b>	<b>Nitrito</b>
322 <sup>ab</sup>	324 <sup>de</sup>	324 <sup>de</sup>	354 <sup>abc</sup>	341 <sup>ab</sup>	324 <sup>c,d</sup>	355 <sup>a</sup>	344 <sup>b</sup>	333 <sup>h</sup>	
<b>335<sup>a</sup></b>	332 <sup>de</sup>	323 <sup>c,d,e</sup>	355 <sup>abc</sup>	342 <sup>ab</sup>	332 <sup>bc</sup>	354 <sup>a</sup>	334 <sup>a</sup>	332 <sup>h</sup>	

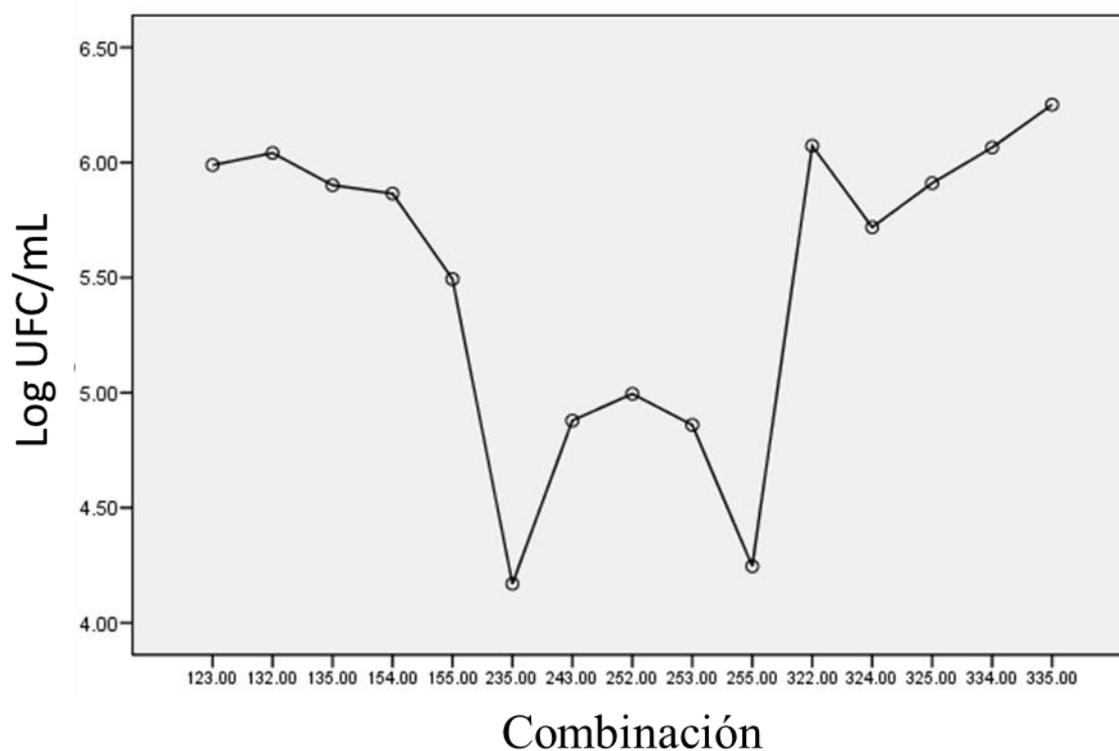
a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,k

Combinación con la misma letra en la misma columna no hay diferencia significativa. Las mejores combinaciones se marcan con negritas.

### 7.1.3 Análisis Microbiológico

El análisis microbiológico se llevó a cabo de acuerdo a lo que marca la norma NOM-034-SSA1-1993, del límite permisible en carne molida, para la cuenta de mesófilos, y el inóculo inicial como límite máximo para *E. coli*. JMP 101. A continuación se muestran los gráficos de las medias marginales, de comparación de medias por el método de Tukey b, para las variables respuesta del microbiológico.

En la figura 5, observamos el comportamiento de las medias marginales de las combinaciones bacteriocina-conservador, con respecto a la variable respuesta de la población de mesófilos. Para la combinación bacteriocina-sorbato de potasio hubo una disminución en la cuenta viable conforme aumento la concentración de los antimicrobianos; en este caso la combinación bacteriocina-sorbato 155 (400UA/g bacteriocina – 5 mg/g sorbato de potasio) mostró el mayor efecto antimicrobiano. Por otra parte, la combinación bacteriocina-lactato de sodio en cualquiera de las concentraciones de prueba mostró el mayor efecto antimicrobiano comparado con las combinaciones de sorbato y nitrito, siendo las combinaciones 235 y 255 las que mostraron una mejor respuesta. En cuanto a nitrito, únicamente la combinación bacteriocina-nitrito 324 tuvo un efecto en la disminución en la población de mesófilos, en las siguientes combinaciones aumentó la población conforme se incrementó la concentración de los agentes antimicrobianos.



**Figura 5. Medias marginales de las combinaciones bacteriocina-sorbato de potasio (123, 132,135,155), bacteriocina- lactato de sodio (235, 243, 252, 253, 255) y bacteriocina-nitrito de sodio (322, 324, 325, 334, 335) con respecto a la población de mesófilos.**

En la figura 6 observamos las medias marginales de las combinaciones bacteriocina-sorbato de potasio, bacteriocina-lactato de sodio y bacteriocina-nitrito de sodio, para la variable respuesta de *E.coli* JMP 101, existiendo una tendencia una tendencia similar, la combinación bacteriocina-sorbato de potasio 155, tuvo un efecto inhibitorio, en el caso de la combinación bacteriocina-lactato de sodio hay un descenso notable, con respecto al antimicrobiano anterior, sin embargo se mantiene casi constante conforme aumento la concentración de bacteriocina-lactato. Nuevamente asciende la población de *E.coli* JMP 101 en las combinaciones de bacteriocina-nitrito de sodio, manteniendo el efecto inhibitorio por debajo del inóculo inicial. En general, las combinaciones bacteriocina- lactato de sodio mostraron un mayor efecto inhibitorio con respecto a las otras combinaciones de conservadores.

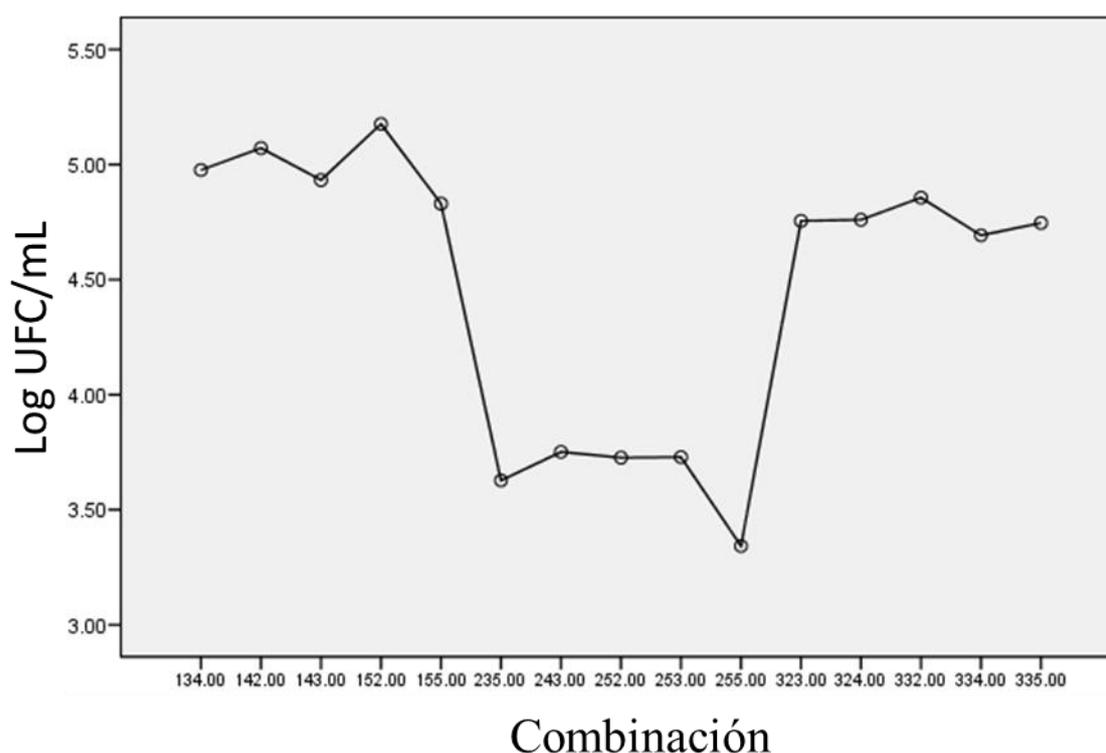
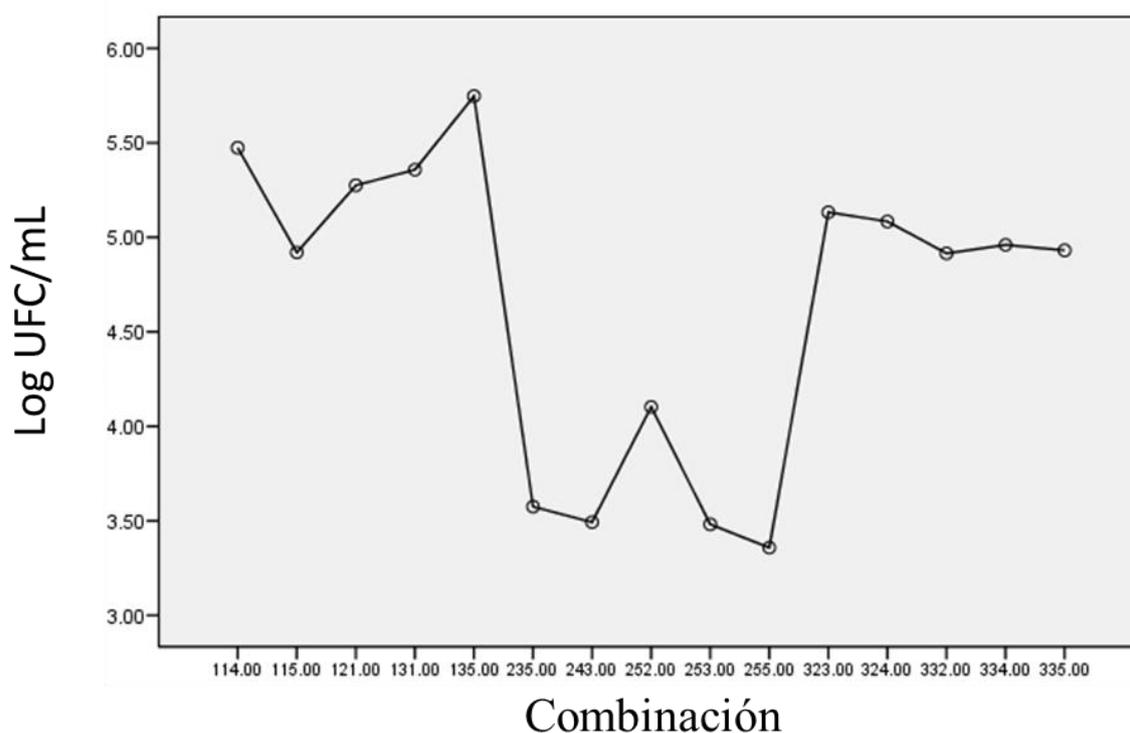


Figura 6. Medias marginales de las combinaciones bacteriocina-sorbato de potasio (134, 142,143,152,155),bacteriocina- lactato de sodio (235, 243, 252, 253, 255) y bacteriocina-nitrito de sodio (323, 324, 332, 334, 335) con respecto a la población de *E. coli* JMP 101.

En la figura 7, se muestran las medias marginales de las combinaciones bacteriocina-sorbato de potasio, bacteriocina-lactato de sodio y bacteriocina-nitrito de sodio, para la variable respuesta de cuenta viable de coliformes. En este caso las combinaciones bacteriocina-sorbato de potasio, inhibieron a la población conforme aumento la concentración. Se aprecia que la combinación 115 fue la que obtuvo el mayor efecto inhibitorio, conformada de la concentración 1 de bacteriocina(0 UA/mL) y la concentración 5 de sorbato de potasio(5 mg/mL). Algunos autores reportan haber obtenido resultados satisfactorios con sorbato de potasio, en la inhibición de enterobacterias, (Robach, 1980; Robach y Sofos, 1982; Zamora y Zaritzky, 1987). Una vez más, las combinaciones bacteriocina-lactato de sodio tuvieron un mayor efecto inhibitorio con respecto a los demás antimicrobianos. Por otro lado, la combinación bacteriocina-nitrito de sodio aumentó ligeramente el efecto inhibitorio conforme aumentó la concentración.

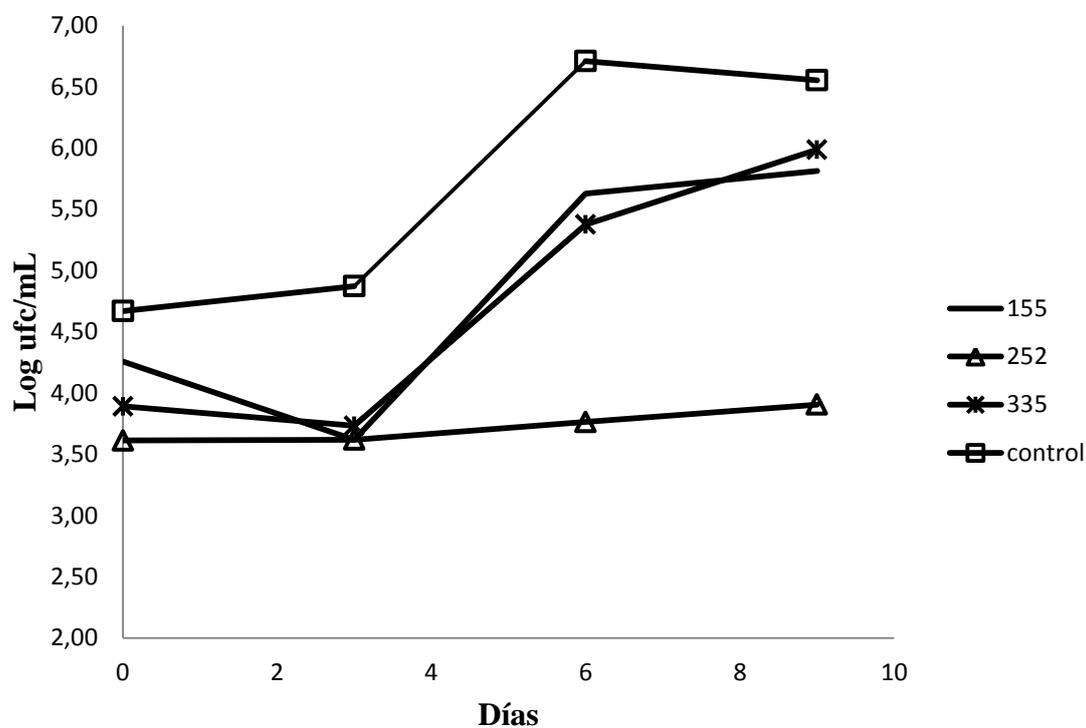


**Figura 7. Medias marginales de las combinaciones bacteriocina-sorbato de potasio (114, 115, 121, 131, 135), bacteriocina- lactato de sodio (235, 243, 252, 253, 255) y bacteriocina-nitrito de sodio (323, 324, 332, 334, 335) con respecto a la población de *Coliformes*.**

A continuación en la figura 8, se muestra el efecto inhibitorio de las combinaciones bacteriocina-sorbato de potasio (155), bacteriocina-lactato de sodio (252) y bacteriocina-nitrito de sodio (335), sobre la carga microbiana de *E. coli* JMP 101 durante el almacenamiento. Como podemos observar el efecto inhibitorio de las combinaciones bacteriocina-sorbato de potasio 155 y bacteriocina-nitrito de sodio 335, tuvieron un comportamiento semejante durante los nueve días de almacenamiento, siendo los primeros tres días donde la inhibición fue mayor, manteniendo en la fase lag al microorganismo reto, después comenzó el crecimiento exponencial, manteniéndose abajo del control en menos de una unidad logarítmica durante todo el almacenamiento. Con lo que respecta al sorbato de potasio, concuerda con lo reportado por diferentes autores sobre la capacidad antimicrobiana de éste compuesto (Greer, 1982; Zamora y Zaritzky, 1987; Friedrich, 2008) contra enterobacterias. Por otra parte, está ampliamente documentado que el nitrito de sodio inhibe a *C. botulinium*, pero algunos autores indicaron la inhibición de nitrito de sodio contra enterobacterias a una concentración de 200 mg/g, en condiciones de temperatura bajas 2 °C, a pH de 5.6; siendo más efectivo en las carnes blancas (Yarbrough y cols., 1980; Nielsen, 1983;).

Por otra parte se observa un fuerte efecto inhibitorio de la combinación bacteriocina-lactato de sodio (252), durante los nueve días de almacenamiento. En estudios anteriores, se demostró que el lactato de sodio, tiene capacidad antimicrobiana contra bacterias patógenas y de deterioro de alimentos (Tan y Shelef, 2002; Stekelenburg, 2003; Seyfert y col., 2007). Además los lactatos han sido utilizados tradicionalmente para mejorar la calidad de los productos cárnicos curados o cocidos, sin embargo es menor lo reportado para carne fresca. (Jensen y col., 2003; Sallam y Semejima, 2004; Knoch y col., 2006) Algunos estudios, mencionaron que al ser aplicado en productos cárnicos a concentraciones del 2 % al 4% no interfiere con la calidad sensorial de la carne (Jensen y col., 2003; Stekelenburg, 2003). La actividad inhibitoria del lactato de sodio, se atribuye en parte a que disminuye la actividad de agua, por ser una sal higroscópica, debido a que la  $A_w$ , tiene gran influencia en el crecimiento de microorganismos, siendo las bacterias patógenas las que necesitan una actividad de agua superior a 0.91, como *E.coli* JMP 101 ( $A_w$  0.96), lo que puede explicar, que tenga ese efecto en productos cárnicos (Debevere, 1989; Chen y Shelef, 1992; De Wit y Rombouts, 1993). Algunos autores reportaron la habilidad que tiene el ácido para penetrar en la célula en forma disociada, acidificando el

interior de la misma, siendo una posible forma de acción de este conservador (Debevere, 1989; Devlieghere y col., 2000).



**Figura 8. Efecto inhibitorio de la combinación bacteriocina-sorbato de potasio(155), bacteriocina-lactato de sodio(252) y bacteriocina-nitrito de sodio(335), sobre la cuenta viable de *E. coli* JMP 101 en el almacenamiento a 4 °C durante 9 días.**

Tomando en cuenta que la nisina es una de las bacteriocinas más estudiadas y que ha sido aprobada por la FDA, siendo reconocida como un conservador GRAS (Generally

Recognized as Safe). Algunos autores reportaron el mejoramiento de la actividad inhibitoria de la combinación nisina y los conservadores utilizados en este estudio en sistemas cárnicos. La combinación de nisina con niveles bajos de nitrito para prevenir el crecimiento de *Clostridium botulinum* (Rayman y col., 1981, 1983; Taylor y col., 1985). Asimismo, señalaron que la combinación de nisina y nitrito retrasan la formación de las toxinas botulínicas, en consecuencia de sus endosporas en sistemas cárnicos. Igualmente incrementó la actividad inhibitoria contra *L. monocytogenes* y *Leuconostoc mesenteroides*.

La combinación de la enterocina EJ97 y la enterocina AS-48 con nitrito inhiben el crecimiento de *L. monocytogenes*, *B. coagulans*, *B. macroides* y *B. cereus* respectivamente (García y col., 2003, 2004; Abriouel y col., 2002).

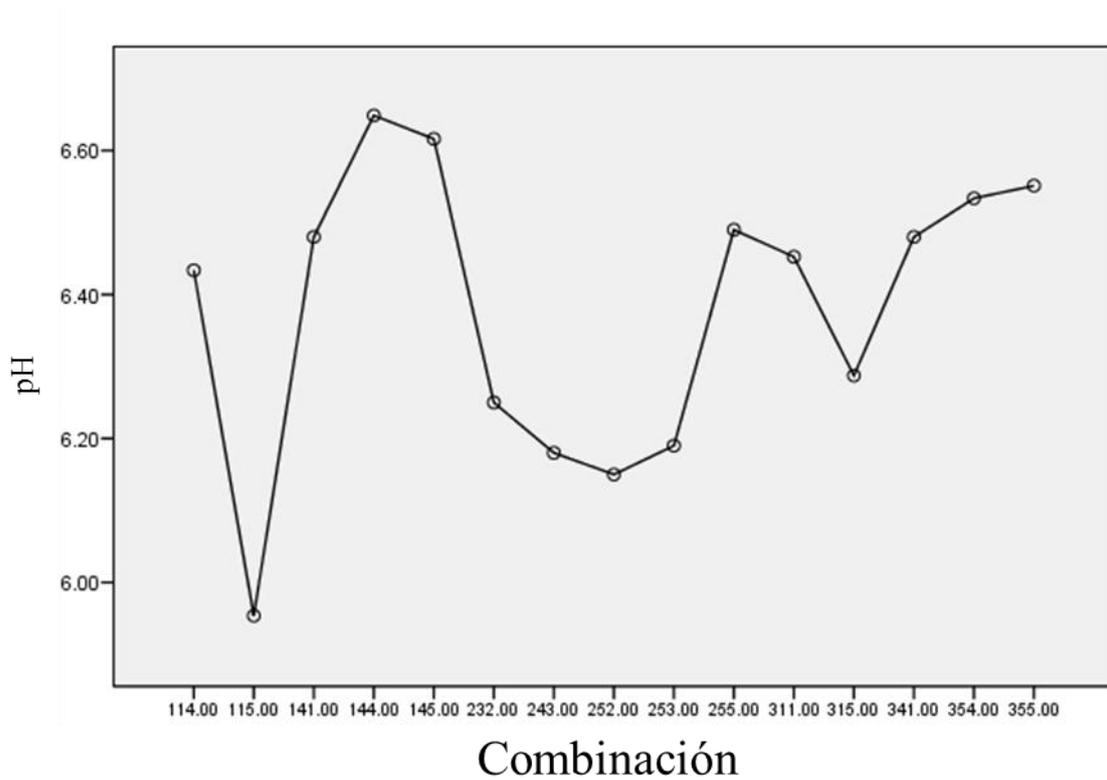
Mientras que la combinación de bacteriocinas con lactato de sodio mejora la actividad antimicrobiana (Jack y col., 1995; Stiles, 1996). El incremento en la carga neta de las bacteriocinas a pH bajo puede facilitar la traslocación de las moléculas por la pared celular, asimismo, la solubilidad se incrementa, facilitando la difusión de las moléculas de bacteriocina (Buncie y col., 1995). Por otro lado, se reportó que *L. monocytogenes* fue sensible a la combinación de nisina (400 UA/mL) con lactato de sodio en diferentes tipos de alimentos (Scannell y col., 1997; Nykänen y col., 2002; Long y Phillips, 2003; Ukuku y Fett, 2004).

## 7.2 pH

Cabe señalar que el criterio para seleccionar las combinaciones del primer estadístico, se tomó en cuenta la determinación del pH 6.5 del control positivo (carne sola), en el día seis de almacenamiento, debido a que en el pH inicial de todas las muestras tuvieron valores arriba de pH 6.0. El pH reportado para la carne de ovino es de 5.8 (Geesink y col., 2000).

A continuación en la figura 9, se muestran las medias marginales de las combinaciones bacteriocina-conservadores, para la variable respuesta de pH. Se observa que la combinación bacteriocina-sorbato de potasio (115), se mantuvo por debajo de pH 6,

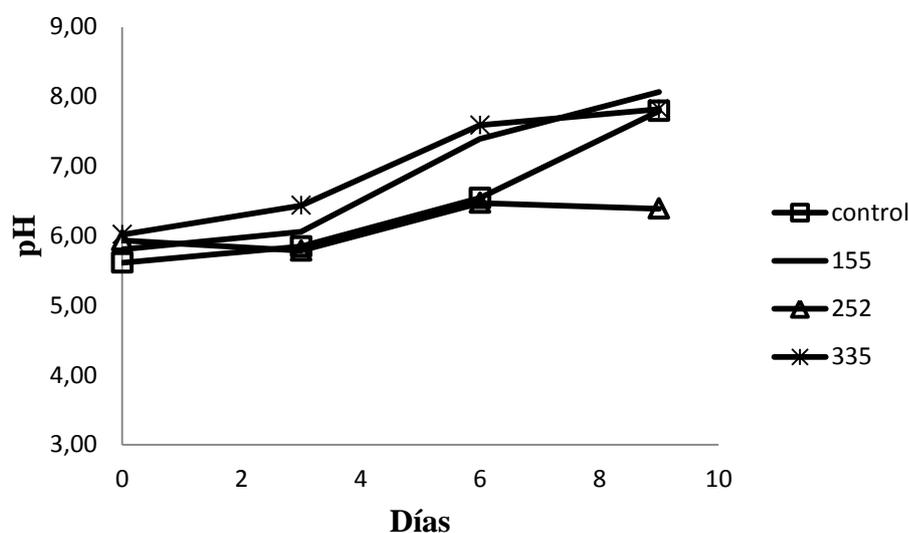
para luego aumentar conforme aumentaba la concentración de ambos conservadores. Entretanto, las combinaciones bacteriocina-lactato de sodio, tuvieron un decremento en el pH con respecto a los otros antimicrobianos. Por otro lado, las combinaciones bacteriocina-nitrito de sodio mostraron una disminución en el pH hasta la combinación 315, después se incrementó conforme aumento la concentración de los ambos antimicrobianos.



**Figura 9. Medias marginales de las combinaciones bacteriocina-sorbato de potasio (114, 115, 141,144,145), bacteriocina-lactato de sodio (232, 243, 252, 253, 255) y bacteriocina-nitrito de sodio (311,315,341,354,355) con respecto al pH.**

En la figura 10, se muestra la variación del pH, de las combinaciones bacteriocina-sorbato de potasio, bacteriocina-lactato de sodio, bacteriocina-nitrito de sodio y el control positivo (carne), durante el almacenamiento, para las combinaciones bacteriocina-sorbato de potasio 155 y bacteriocina-nitrito de sodio 335, en estas combinaciones se observó un aumento en el pH. Como podemos apreciar en la figura 7, la combinación bacteriocina-lactato de sodio 252 tuvo un comportamiento de variación en el pH, semejante al control

(pH 6.55), hasta el día 6 de almacenamiento, a partir del cual la combinación 252(pH 6.39), tuvo un descenso en el pH



**Figura 10. Variación del pH de las combinaciones de bacteriocina- sorbato de potasio(155) y bacteriocina-lactato de sodio (252) y bacteriocina,-nitrito de sodio(335), en el almacenamiento a 4 °C durante 9 días.**

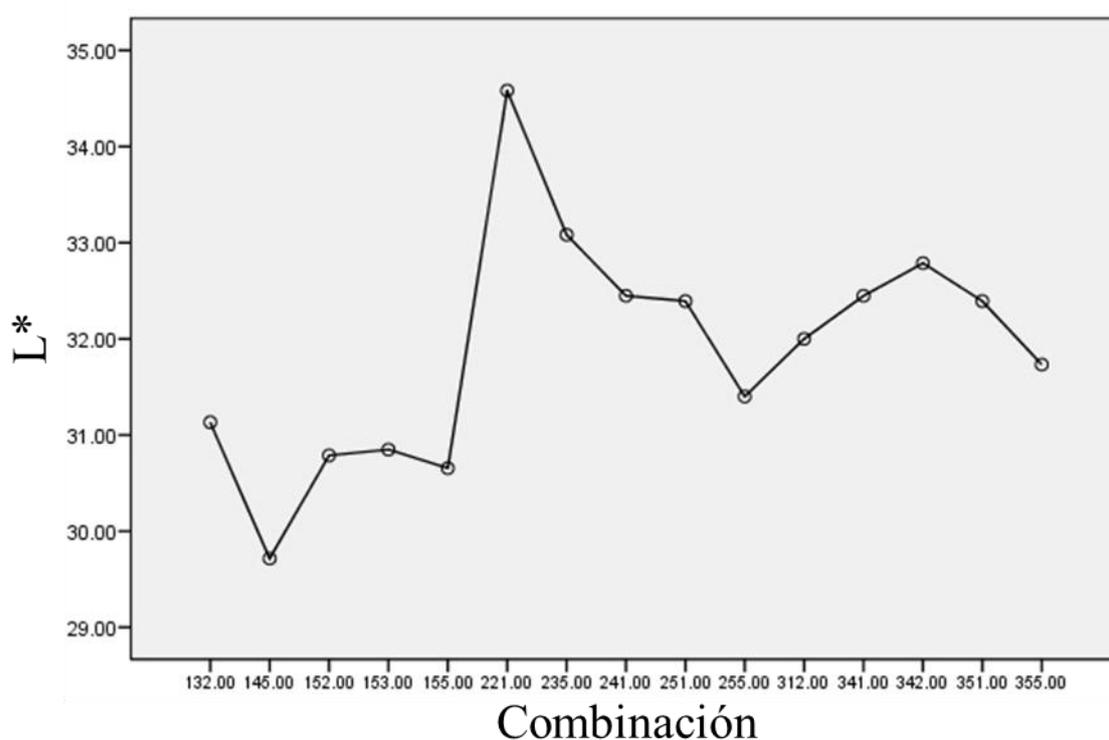
El aumento de pH puede estar relacionado por la proteólisis enzimática, y por la presencia de microorganismos durante el almacenamiento. El pH de la carne aumenta como resultado de la acumulación de amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), por la desaminación de los aminoácidos (Karabagias y col., 2011), aunado a lo anterior los microorganismos hidrolizan las proteínas dejando aminoácidos y péptidos pequeños, los cuales hacen que la carga del medio cambie. (Masana, y col., 2006).

### 7.3. Color

#### ◆ Componente L

El intervalo de valores del componente  $L^*$ , en este ensayo, fue de 28 a 35 y el control (carne) fue de 26 a 32; estos valores son menores a lo reportado por Geesink y col. (2000), (48.8-49.9) para carne de ovino (músculo *Longissimus*) en almacenamiento a 5 °C. y por Karabagias y col (2011), (37.5-40.5) para pierna de ovino en almacenamiento a 4 °C.

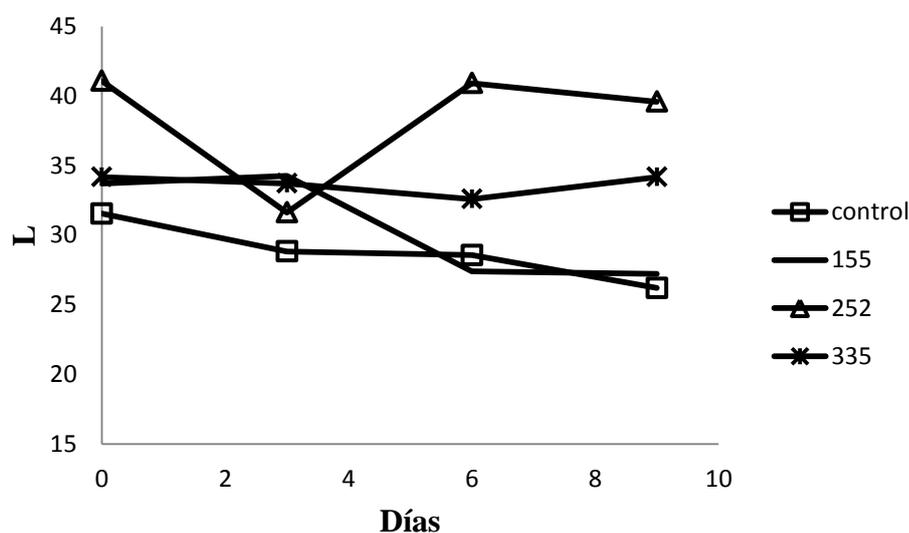
En la figura 11, se observan las combinaciones de bacteriocina-sorbato de potasio, bacteriocina-lactato de sodio y bacteriocina-nitrito de sodio, con respecto a la variable respuesta del componente L\*, como podemos ver los valores más bajos fueron para la combinación bacteriocina-sorbato de potasio (132,145,152,153,155), y el valor más alto lo obtuvo la combinación de bacteriocina-lactato de sodio en la concentración más baja (221). Por otro lado, al incrementarse la concentración para esta combinación la luminosidad bajó, la combinación bacteriocina-nitrito de sodio (312,341,342,351 y 355) presentó valores de 31 a 33.



**Figura 11.** Medias marginales de las combinaciones bacteriocina-sorbato de potasio (132,145,152,153,155), bacteriocina-lactato de sodio (221, 235, 241, 251, 255) y bacteriocina-nitrito de sodio (312,341,342,351,355) con respecto al componente L.

En la figura 12, se observa la variación del componente L\* con respecto al almacenamiento de las mejores combinaciones bacteriocina-conservador y el control. Se observa que la combinación de bacteriocina-sorbato de potasio 155 presentó un valor de 34 los primeros días, sin embargo, en los días 6 y 9 tuvo un comportamiento muy parecido al control. La combinación de bacteriocina-lactato de sodio 252 tuvo el valor más alto

inicialmente de 41, disminuyendo hasta 31 en el día 3 de almacenamiento, para nuevamente aumentar hasta 39 en el día 9 de almacenamiento tomando valores más cercanos a lo reportado para carne de ovino de 40, en almacenamiento a 4 °C (Karabigias, y col, 2011). La combinación bacteriocina-nitrito de sodio 335 se mantuvo constante en todos los días de almacenamiento, debido a que el nitrito de sodio fungió como un estabilizador en cuanto a la luminosidad.

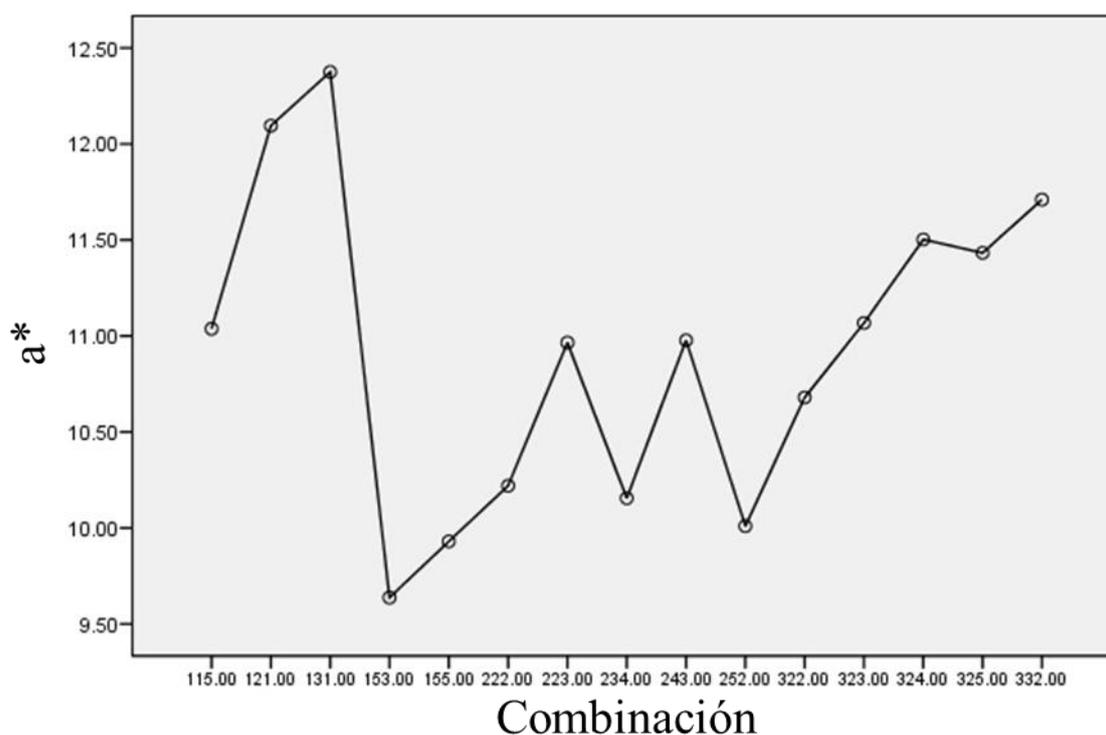


**Figura 12.** Variación de la luminosidad de las combinaciones bacteriocina-sorbato de potasio (155), bacteriocina-lactato de sodio (252), bacteriocina-nitrito de sodio (335) y el control (carne), en el almacenamiento durante 9 días a 4 °C.

#### ◆ Componente a

La coordenada a define la desviación del punto acromático correspondiente a la luminosidad, hacia el rojo si  $a^*$  es positiva y hacia el verde si  $a^*$  es negativa. En la figura 13, se aprecia el comportamiento del componente  $a^*$  en las combinaciones bacteriocina-sorbato de potasio, bacteriocina-lactato de sodio y bacteriocina-nitrito de sodio. En la combinación de bacteriocina-sorbato de potasio aumentó el componente  $a^*$  con respecto a la concentración de sorbato cero, en las concentraciones 2 y 3. Disminuyendo con el

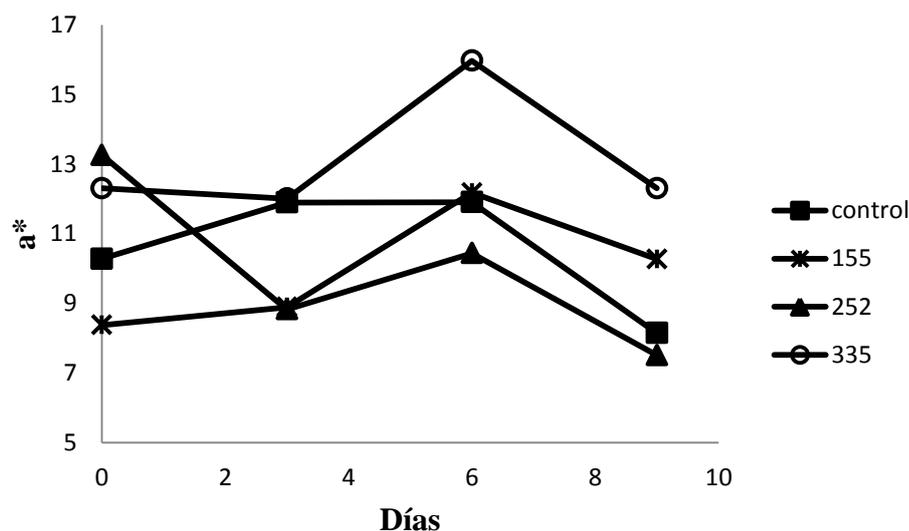
aumento de la concentración de los dos conservadores. Por otro lado, las combinaciones bacteriocina-lactato de sodio se incrementó el valor de la media marginal en la concentración uno, con un decremento en la concentración e, observándose este comportamiento en las siguientes concentraciones. En las medias marginales de las combinaciones de bacteriocina-nitrito de sodio, aumentó el valor del componente a\* conforme fue aumentado la concentración de ambos antimicrobianos.



**Figura 13. Medias marginales de las combinaciones bacteriocina-sorbato de potasio (115,121,131,153,155), bacteriocina- lactato de sodio (222, 223, 234, 243, 252) y bacteriocina-nitrito de sodio (322,323,324,325,332) con respecto al componente a\*.**

A continuación se analizará la variación del componente a\* de las combinaciones bacteriocina-sorbato de potasio, bacteriocina-lactato de sodio, bacteriocina-nitrito de sodio, durante el almacenamiento (figura 14). La combinación bacteriocina-sorbato de potasio 155(400UA/g bacteriocina-5mg sorbato de sodio) tuvo un valor constante hasta el día tres de almacenamiento, presentando un aumento en los subsiguientes días tomando valores por arriba del control. La combinación bacteriocina-lactato de sodio 252(400UA/g bacteriocina-0.96mL/g de lactato de sodio) tuvo una disminución en el componente a\* en el día 3 de almacenamiento, incrementándose en el día 6, finalmente disminuyó en el día 9

observando valores cercanos al control. La combinación de bacteriocina-nitrito de sodio 335(100UA/g bacteriocina-0.5mg/g nitrito de sodio) se mantuvo constante los dos primeros días de almacenamiento, enseguida aumentó tomando valores más altos que el control, los resultados en esta combinación indican la presencia de nitrosilmioglobina de color rojo, producto de la reacción del óxido nítrico y la mioglobina de la carne.

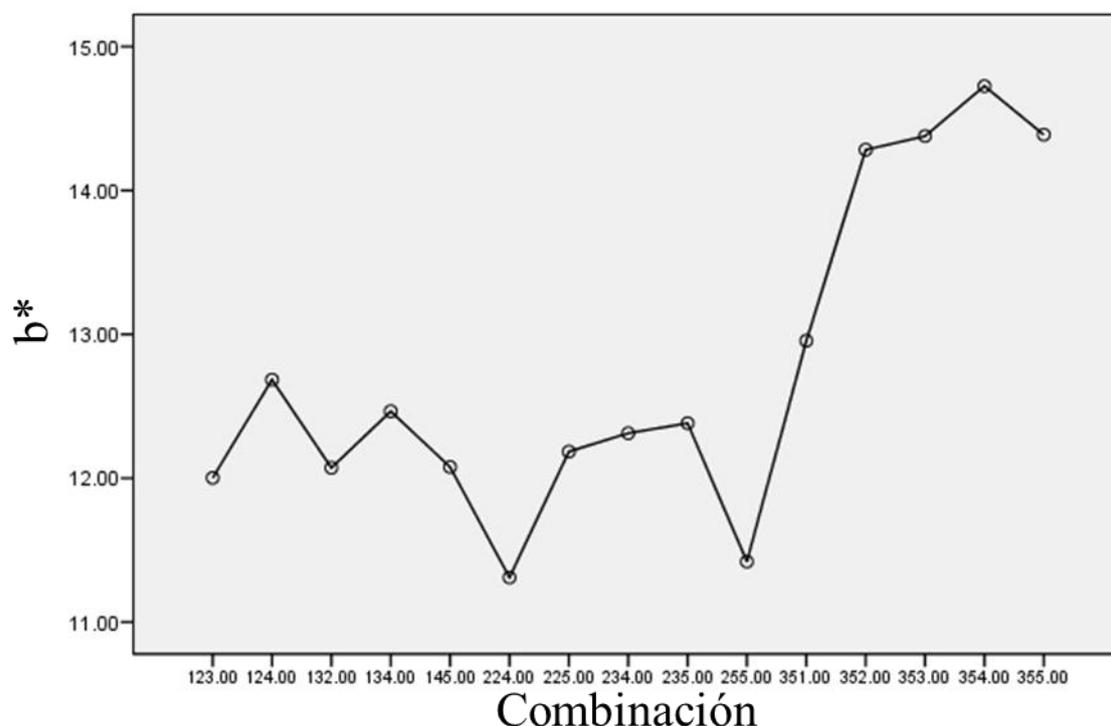


**Figura 14. Variación del componente a\* del color de las combinaciones de bacteriocina-sorbato de potasio (155), bacteriocina-lactato de sodio (252), bacteriocina-nitrito de sodio (335) y el control durante el almacenamiento a 4 °C**

#### ◆ Componente b

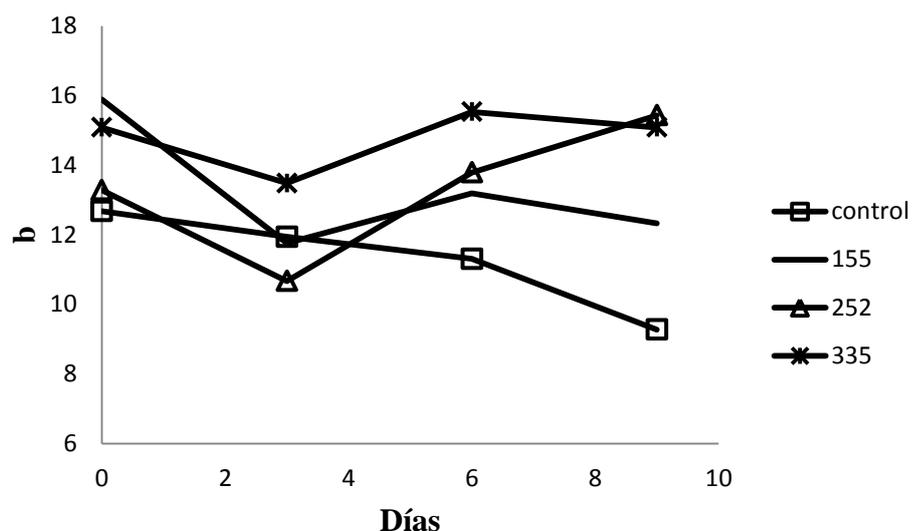
Si  $b^*$  es positiva se dirige hacia el amarillo y hacia el azul si  $b^*$  es negativa (Gilbert, 1992). En la figura 15, se presenta el comportamiento del componente  $b^*$  de las combinaciones bacteriocina-sorbato de potasio, bacteriocina-lactato de sodio y bacteriocina-nitrito de sodio. En cuanto a bacteriocina-sorbato de potasio se observó una variación de 12 a 13 en las medias marginales, con tendencia al amarillo. Por otro lado en la combinación de bacteriocina-lactato de sodio los valores que tomaron oscilaron de 11 a 12, mientras que para las medias marginales de bacteriocina-nitrito de sodio los valores

incrementaron al aumentar la concentración de ambos conservadores, el nitrito de sodio. En este componente se observa la influencia del nitrito de sodio que es usando en la industria cárnica como potenciador y estabilizador del color



**Figura 15. Medias marginales de las combinaciones de bacteriocina-sorbato de potasio (123,124,132,134,145), bacteriocina-lactato de sodio(224,225,234,235,255) y bacteriocina nitrito de sodio(351,352,353,354,355), con respecto a la variable respuesta del componente del color: b\***

En la figura 16, se aprecia una disminución en el componente b\* en las combinaciones bacteriocina-sorbato de potasio, bacteriocina-lactato de sodio, bacteriocina-nitrito de sodio y el control de carne, durante el almacenamiento, observándose una disminución en el día 3 de refrigeración. La combinación bacteriocina-sorbato de potasio 155 tuvo un pequeño incremento en el día 6, enseguida disminuyó en el día nueve de almacenamiento. Entretanto, los valores de la combinación bacteriocina-lactato de sodio 252, se incrementaron en el día 3 y 9. Sin embargo, los valores de la combinación bacteriocina-nitrito de sodio fueron más estables en todo el almacenamiento, esto se debe a la influencia del nitrito de sodio.



**Figura 16. Variación del componente a\* del color de las combinaciones de bacteriocina-sorbato de potasio (155), bacteriocina-lactato de sodio (252), bacteriocina-nitrito de sodio(335) y el control durante el almacenamiento a 4 °C**

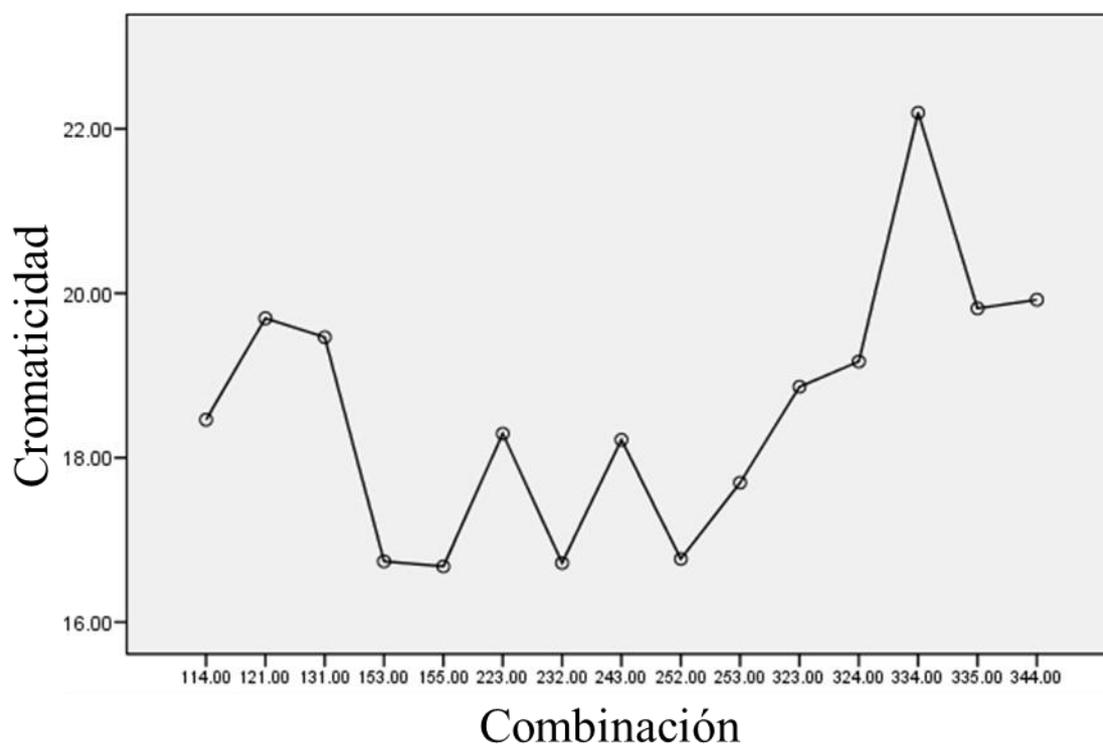
Algunos autores mencionan que para la carne de ovino sin ningún aditivo, durante el almacenamiento durante 14 días a 5 °C, el componente a\* disminuyó, y b\* se incrementó o se mantuvo constante (Geesink y col., 1981; Priolo y col., 2005 Vasta y col., 2007).

### 7.3.1 Cromaticidad

La saturación o cromaticidad, expresada en forma adimensional, indica que tan intenso es el tono de un color observado, en caso de la carne fresca, el valor del croma se relaciona con el contenido de metamioglobina (Mancini y Hunt, 2005) y con el color rojo. Tomando valores mayores a 20 que indican un color rojo brillante, hasta valores de 12 que indican un color marron (Mac Dougall, 1981; Hutchings, 1994).

Se analizaron las combinaciones bacteriocina-conservador, (Figura 17), las combinaciones bacteriocina-sorbato de potasio 114, 121 y 131, tuvieron valores entre 18.5 y 19.5, mientras las combinaciones 153 y 155 tomaron un valor de 17, este valor es más

alto a lo reportado para carne de ovino en almacenamiento durante 14 días a 4 °C (Vasta y col., 2007; Priolo y col., 2005). En las combinaciones de bacteriocina-lactato de sodio, presentaron valores de 18 las combinaciones 223 y 243, mientras que las combinaciones 232 y 252 fue de 17. Por último las combinaciones de bacteriocina-nitrito de sodio aumento en las tres primeras combinaciones, hasta alcanzar un máximo en la combinación 334, de 22, disminuyendo en las últimas combinaciones 335 y 344 obteniendo un valor de 19, tuvieron los valores más altos muy probablemente por la influencia del nitrito de sodio.



**Figura 17. Medias marginales de las combinaciones de bacteriocina-sorbato de potasio (114,121,131,153,155), bacteriocina-lactato de sodio (223,232,243,252,253) y bacteriocina nitrito de sodio (323,324,334,335,344), con respecto a la variable respuesta de cromaticidad, durante el almacenamiento a 4 °C**

A continuación, en la figura 18 se observa el comportamiento de la cromaticidad, de las combinaciones bacteriocina-conservador durante el almacenamiento a 4 °C, en donde vemos que las combinaciones bacteriocina-sorbato de potasio (155) y bacteriocina-lactato de sodio (252) tuvieron una variación muy similar, teniendo una tendencia a disminuir los tres primeros días, posteriormente tuvieron un incremento, hasta el día seis, para nuevamente disminuir hasta el día nueve, el mismo comportamiento lo tuvo la

combinación bacteriocina-nitrito de sodio 335, solo que con valores más altos de cromaticidad (mayor intensidad de color), se observa el comportamiento del control que no tiene (ningún conservador), el cual se mantiene constante para empezar a disminuir a partir del día seis de almacenamiento.

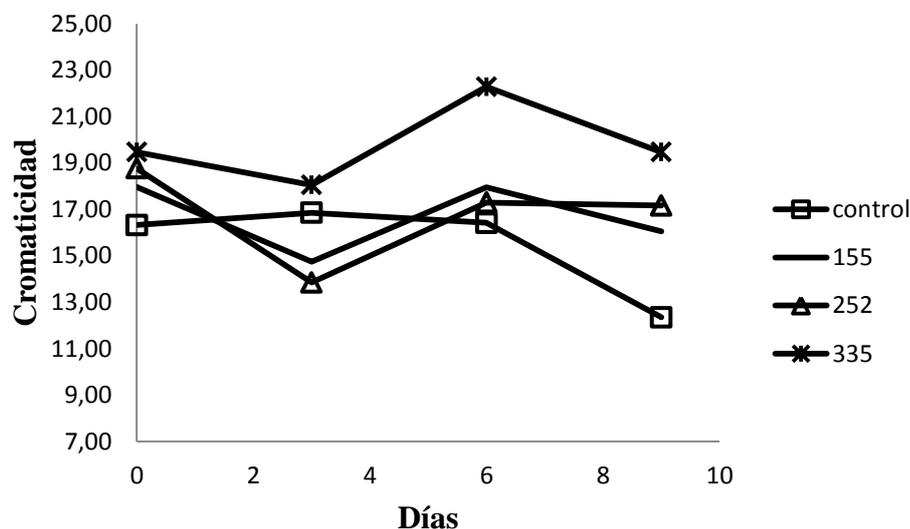


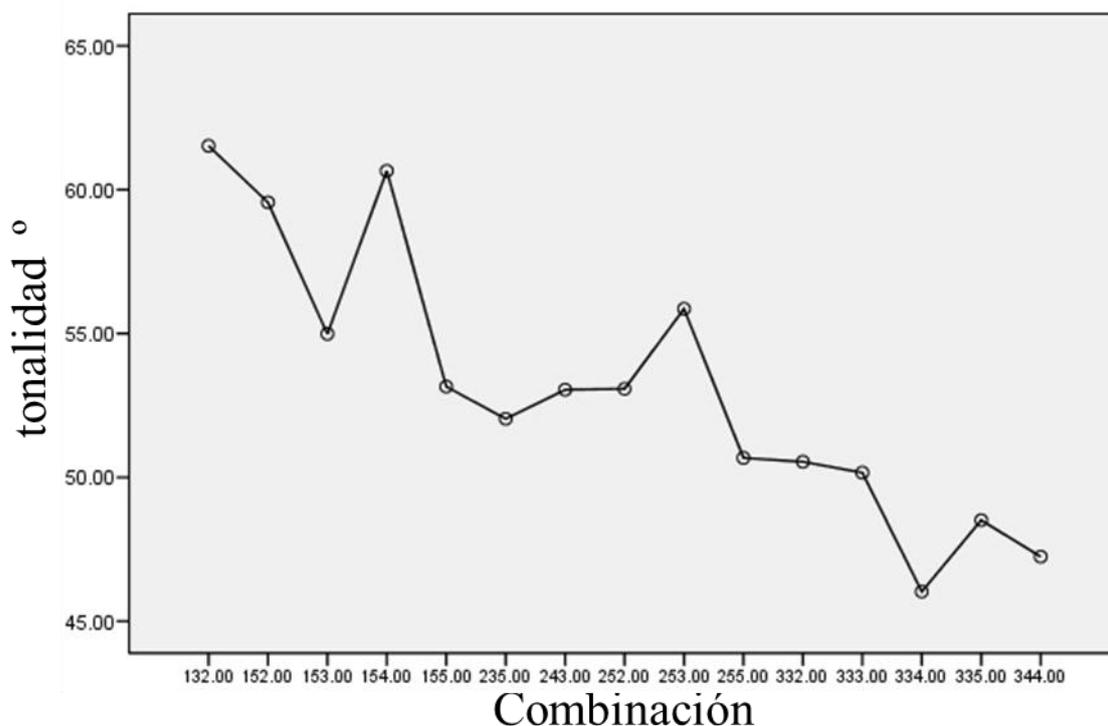
Figura 18. Variación de la cromaticidad de las combinaciones: bacteriocina-sorbato de potasio (155), bacteriocina-lactato de sodio (252), bacteriocina-nitrito de sodio (335) y el control durante el almacenamiento a 4 °C.

### 7.3.2 Tonalidad

La tonalidad es expresada en grados, refleja la variación del color desde 0 ° = rojo, 90 ° = amarillo, 180 ° = verde y 270 ° = azul. Los valores de tonalidad que toma la carne fresca, se encuentran entre 0 ° y 90 ° (Hunt, 1980).

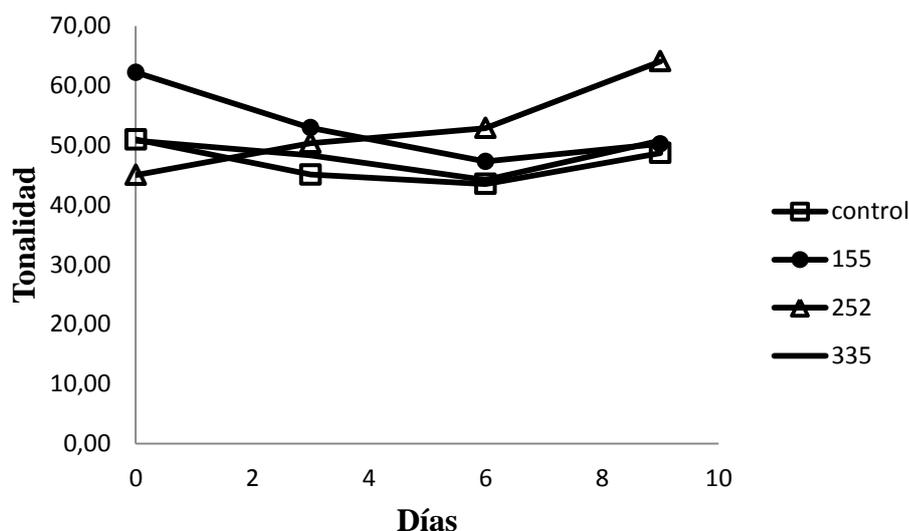
En la figura 19, muestra el comportamiento de las combinaciones de bacteriocina-conservador con respecto a la tonalidad. Los valores de la combinación bacteriocina-sorbato de potasio disminuyeron conforme aumenta la concentración; sin embargo la combinación 155 no presento esta tendencia. La combinación 155 obtuvo el valor más bajo de 52.5, teniendo las concentraciones más altas de ambos conservadores. Por otro lado, la combinación bacteriocina-lactato de sodio (235, 243,252,255) obtuvo valores que oscilaron entre los 50 y 55 °. Con lo que respecta a los valores de la combinación bacteriocina-nitrito

de sodio (332,333,334,335,344) disminuyeron conforme se incrementó la concentración de ambos conservadores.



**Figura 19. Medias marginales de las combinaciones de bacteriocina-sorbato de potasio (132,152,153,154,155), bacteriocina-lactato de sodio (235,243,252,253,255) y bacteriocina nitrito de sodio (332,333,334,335,344), con respecto a la variable respuesta de tonalidad, durante el almacenamiento a 4 °C**

El comportamiento de la tonalidad para la combinación bacteriocina-sorbato de potasio 155, bacteriocina-lactato de sodio 252, bacteriocina-nitrito de sodio 335 y el control se muestra en la figura 20. Las combinación 155 y 335 tendieron a disminuir junto con el control, durante el almacenamiento, mientras que la combinación 252 tuvo un incremento durante todo el almacenamiento.



**Figura 20. Variación de la tonalidad de las combinaciones: bacteriocina-sorbato de potasio (155), bacteriocina-lactato de sodio (252), bacteriocina-nitrito de sodio (335) y el control durante el almacenamiento a 4 °C**

Los valores de la tonalidad de todas las combinaciones corresponden al tono rojo reportado para carne de ovino (h° 34-54) en almacenamiento a 4 °C, y los valores de la cromaticidad que indica el grado de saturación de ese tono rojo, son más altos a lo indicado en la literatura (C 15) (Priolo y col., 2005), esto muy probablemente a la influencia positiva que ejercieron los antimicrobianos a la carne. Por otra parte la carne tiene pocos carbohidratos, al ser inoculada con *E.coli* JMP 101 utilizó ésta fuente de carbono, enseguida consumió proteínas, entre ellas, la mioglobina. (Masana y Rodriguez; 2006; Álvarez, 2006). Por lo anterior, se concluyó que las muestras de las combinaciones analizadas tienen buena calidad, ya que obtuvieron valores aceptables en los parámetros estudiados. Además, de que las combinaciones 155 (bacteriocina –sorbato de potasio), 252 (bacteriocina-lactato de sodio) y 335 (bacteriocina-nitrito de sodio), tuvieron un efecto bacteriostático contra *E.coli* JMP 101.

## 7.4 Fase 2

Para determinar la vida de anaquel de los tres productos cárnicos (birria de carne de ovino enlatada, hamburguesas de carne de ovino y fajitas marinadas de carne de ovino) se evaluaron los siguientes parámetros de calidad: análisis microbiológico, pH, color y rancidez. La base de datos así como las gráficas obtenidas se encuentran en el Anexo 5. El primer paso para estimar la vida de anaquel, en el caso del análisis microbiológico, una vez obtenida la población en unidades logarítmicas, se graficó el log ufc/mL y en las abscisas el tiempo. A partir de esta gráfica se obtuvo la ecuación de la recta donde la pendiente es igual a la velocidad de crecimiento específica ( $\mu$ ). Se calculó la velocidad de crecimiento específica ( $\mu$ ) para cada temperatura. Posteriormente aplicando el modelo de Arrhenius, se estableció la Energía de activación ( $E_a$ ). Finalmente la velocidad específica se obtuvo por interpolación en la ecuación de la recta y con ambos parámetros se determinó la vida de anaquel, tomando en cuenta el valor límite para cada parámetro de calidad.

### 7.4.1 Vida de anaquel de birria de cordero enlatada.

Para estimar la vida de anaquel de la birria de carne de ovino enlatada se tomó como temperatura estándar 25°C. Las muestras para su análisis se etiquetaron de la siguiente forma: Ba (muestra de arriba de la lata), Bm (muestra de en medio de la lata) y Bb (muestra de abajo de la lata), para la marca comercial “Chilorio”: Cha (muestra de arriba de la lata), Chm (muestra de en medio de la lata) y Chb (muestra de abajo de la lata). A continuación en la tabla 5, se muestra la energía de activación, la velocidad específica y la vida de anaquel estimada para birria de carne de ovino enlatada, donde las variables de rancidez (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) y pH, se tomaron como parámetros para estimar la vida de anaquel a 25 °C. La variable de respuesta de rancidez se consideró como limitante, porque tomó los valores más bajos, por lo que la vida de anaquel estimada para la birria fue de 13 meses, mientras que para la marca comercial fue de 56 meses. Se carece de información sobre la adición de algún antioxidante en el producto comercial, sin embargo, para la birria de carne de ovino fue adicionada con EDTA y citrato sódico como antioxidantes, en concentraciones de acuerdo a la norma (NOM-130-SSA1-1995).

**Tabla 5. Energía de activación y velocidad específica de crecimiento a 25 y 37 °C, empleadas para estimar la vida de anaquel de birria de cordero enlatada, con respecto a la variación de pH y rancidez.**

Variable respuesta	Tratamiento	Ba	Bm	Bb	Cha	Chm	Chb
<b>Rancidez</b> (valor límite 0.6)	<i>Ea</i> (KJ/kg°K)	9.2E <sup>4</sup>	2.1E <sup>5</sup>	4.1E <sup>4</sup>	1.5E <sup>5</sup>	2.4E <sup>5</sup>	2.3E <sup>5</sup>
	$\mu$ a 25 °C	0.181	0.020	0.023	0.035	0.01	0.01
	Vida de anaquel (meses)	33	81	13	56	90	88
	R <sup>2</sup>	1	1	1	1	1	1
<b>pH</b> (valor límite 4.6)	<i>Ea</i> (KJ/kg°K)	1.2E <sup>5</sup>	1.4E <sup>5</sup>	1.3E <sup>5</sup>	4.8E <sup>4</sup>	2.5E <sup>4</sup>	1.1E <sup>5</sup>
	$\mu$ a 25 °C	0.038	0.023	0.029	0.048	0.076	0.034
	Vida de anaquel (meses)	121	199	156	95	60	133
	R <sup>2</sup>	1	1	1	1	1	1

*Ea* energía de activación,  $\mu$  velocidad específica de crecimiento, R<sup>2</sup> coeficiente de regresión lineal

#### 7.4.2 Vida de anaquel de fajitas marinadas de carne de ovino.

En la tabla 6, se observa la energía de activación *Ea*, la velocidad específica  $\mu$  y la vida de anaquel de las fajitas marinadas de carne de ovino a 4 °C, las variables de cuenta viable de mesófilos, pH, diferencial de color  $\Delta E$ , y rancidez se tomaron como parámetros para estimar la vida de anaquel. Para su análisis las muestras se etiquetaron como MAO (fajitas marinadas de carne de ovino) y MAK (carne de ovino comercial)

**Tabla 6. *Ea* y velocidad específica ( $\mu$ ) a 4 °C empleadas para estimar la vida de anaquel de fajitas marinadas de carne de ovino con respecto a la cuenta viable de mesófilos, pH,  $\Delta E$  de color y rancidez**

Variable respuesta	Tratamiento	MAO	MAK
<b>Mesofilos</b> (límite máximo log 6 ufc/mL)	<i>Ea</i> (KJ/kg°K)	3.8E <sup>4</sup>	5.0E <sup>4</sup>
	$\mu$ a 4 °C	1.35	1.30
	Vida de anaquel (días)	11.3	11.8
	R <sup>2</sup>	1	1
<b>pH</b> (límite máximo pH 6)	<i>Ea</i> (KJ/kg°K)	9E <sup>4</sup>	3E <sup>4</sup>
	$\mu$ a 4 °C	0.014	0.014
	Vida de anaquel (días)	333	353
	R <sup>2</sup>	1	1
<b><math>\Delta E</math> de Color</b> (límite máximo 4.5)	<i>Ea</i> (KJ/kg°K)	7.8E <sup>4</sup>	9.6E <sup>4</sup>
	$\mu$ a 4 °C	0.20	0.17
	Vida de anaquel (días)	22	26
	R <sup>2</sup>	1	1
<b>Rancidez</b> (valor límite 0.6)	<i>Ea</i> (KJ/kg°K)	1.6E <sup>5</sup>	4.4E <sup>4</sup>
	$\mu$ a 4 °C	0.0072	0.0254
	Vida de anaquel (días)	83	24
	R <sup>2</sup>	1	1

*Ea* energía de activación,  $\mu$  velocidad específica de crecimiento, R<sup>2</sup> coeficiente de regresión lineal

La vida de anaquel de la variable de mesófilos para la muestra MAO fue de 11.3 días, y para la muestra MAK fue de 11.8, siendo ésta la variable limitante a 4 °C, debido a que las muestras se empacaron al vacío, existió un desarrollo de bacterias lácticas. Para la variable de pH la vida de anaquel para la muestra MAO fue de 333 días y para muestra MAK fue de 353, el pH fue muy estable probablemente en el caso de la muestra MAO, por la adición de fosfatos y estabilizaron el pH. Para la variable del diferencial del color ( $\Delta E$ ) la vida de anaquel para la muestra MAO fue de 22 días y para la muestra MAK fue de 26 días. El color no mostró variación durante el almacenamiento entre los tratamientos MAO y MAK (Figura 21). Finalmente en cuanto a la variable de rancidez, la vida de anaquel para la muestra MAO fue de 83 y para la muestra MAK fue de 24: l la vida de anaquel fue alta debido a la adición de fosfato, el cual funcionó como antioxidante.



**Figura 21. Fajitas marinadas de carne de cordero MAO y marinado comercial MAK a 4 °C, en el día 14 de almacenamiento**

#### **7.4.3 Vida de anaquel de hamburguesas de carne de ovino**

En la tabla 7, se muestra la energía de activación  $E_a$ , la velocidad específica ( $\mu$ ) y la vida de anaquel de hamburguesas de carne de ovino a 4 °C. Las variables de cuenta viable de mesófilos, pH, diferencial de color  $\Delta E$ , y rancidez se tomaron como parámetros para estimar la vida de anaquel. Para el análisis las muestras se etiquetaron como: O (hamburguesa de carne de ovino, empacada en película impermeable al oxígeno), AMO (hamburguesa de carne de ovino en atmosfera modificada), SK (hamburguesa comercial,

empacada en película impermeable al oxígeno) y AMSK (hamburguesa comercial, en atmosfera modificada)

A la temperatura de 4 ° C la vida de anaquel para la variable mesófilos para la muestra O fue de 46 días, para la muestra AMO fue de 49, para la muestra SK fue de 74, y para la muestra AMSK fue de 112, existió una diferencia entre los productos: Para la carne de ovino la cuenta microbiana fue más alta, por el valor nutritivo que tiene ésta carne; mientras que la cuenta microbiana fue menor en el producto comercial, debido probablemente al conservador utilizado, también existió una diferencia entre el producto SK y AMSK por el efecto del empaque en atmosfera modificada la cuenta microbiana fue menor. La vida de anaquel para la muestra O fue de 103 días y para AMO fue de 125 días, para SK fue de 67 días y para AMSK fue de 76 días en la variable pH. El pH fue estable probablemente en el caso de la hamburguesa con carne de ovino, por la adición de cloruro de sodio el cual produjo un efecto positivo en el pH. Asimismo, existió diferencia entre empaques, siendo mejor el empaque en atmosfera modificada.

**Tabla 7.  $E_a$  y velocidad específica ( $\mu$ ) a 4 °C, empleadas para estimar la vida de anaquel de fajitas marinadas de carne de ovino, con respecto a la cuenta viable de mesófilos, pH,  $\Delta E$  de color y rancidez.**

Variable respuesta	Tratamiento	O	AMO	SK	AMSK
<b>Mesófilos</b>	$E_a$ (KJ/kg°K)	7.5E <sup>4</sup>	5.0E <sup>4</sup>	3.3E <sup>4</sup>	1.4E <sup>4</sup>
	$\mu$ a 4 ° C	0.33	0.31	0.21	0.14
	Vida de anaquel (días)	46	49	74	112
<b>(límite máximo log 6ufc/mL)</b>	$R^2$	0.82	0.89	0.92	0.25
	$E_a$ (KJ/kg°K)	7.9E <sup>4</sup>	7.0E <sup>4</sup>	7.9E <sup>4</sup>	9.0E <sup>4</sup>
<b>pH</b>	$\mu$ a 4 ° C	0.06	0.05	0.09	0.08
	Vida de anaquel (días)	103	125	67	76
	$R^2$	0.98	0.70	0.84	0.86
<b><math>\Delta E</math> de Color</b>	$E_a$ (KJ/kg°K)	6.1E <sup>4</sup>	5.2E <sup>5</sup>	6.4E <sup>4</sup>	3.8E <sup>5</sup>
	$\mu$ a 4 ° C	0.22	0.21	0.77	0.58
	Vida de anaquel (días)	20	21	6	8
<b>(límite máximo 4.5)</b>	$R^2$	0.99	0.95	0.99	0.91
	$E_a$ (KJ/kg°K)	9.9E <sup>3</sup>	2.2E <sup>4</sup>	3.7E <sup>4</sup>	3.5E <sup>4</sup>
<b>Rancidez</b>	$\mu$ a 4 ° C	0.021	0.014	0.025	0.017
	Vida de anaquel (días)	28	41	24	35
	$R^2$	0.07	0.35	0.94	0.90

$E_a$  energía de activación,  $\mu$  velocidad específica de crecimiento,  $R^2$  coeficiente de regresión lineal

Para la variable del diferencial del color la vida de anaquel para la muestra O fue de 20 días, la muestra AMO fue de 21 días, para la muestra SK fue de 6 días, y para la muestra AMSK fue de 8 días, siendo ésta variable la limitante, para determinar la vida de anaquel, (figura 22). La muestra con carne de ovino fue más estable, porque se le adicionó citrato sódico que actúa como estabilizante del color, no hubo diferencia entre empaques. Por último para la variable de rancidez, la vida de anaquel para la muestra O fue de 47 días, para la muestra AMO fue de 69 días, para la muestra SK fue de 40 días y para la muestra AMSK fue de 58 días. En la hamburguesa con carne de ovino el efecto positivo se debió a la adición de citrato sódico y de fosfatos (antioxidantes), el empaque en atmosfera modificada (70% de N<sub>2</sub>, 30% CO<sub>2</sub>) fue mayor, debido al contenido de O<sub>2</sub> inferior al 0.5%, ya que la oxidación es causada por la reacción del oxígeno atmosférico con las dobles ligaduras de las grasas insaturadas de la carne.



**Figura 22. Hamburguesas de carne de ovino (O), en atmosfera modificada (AMO), marca comercial (SK), en atmosfera modificada (AMSK), a 4 °C en el día 14 de almacenamiento.**

## CONCLUSIÓN

Las combinaciones bacteriocina-conservador que resultaron tener un efecto sinérgico contra *E. coli* JMP 101, fueron: BE 400 UA/g / LS 0.096 mL/g, BE 400 UA/g / PS 5 mg/g y BE 100 UA/g / NS 0.5 mg/g, y la mejor combinación bacteriocina-conservador fue BE 400 UA/g / LS 0.096 mL/g, debido a que tiene la concentración más baja utilizada de lactato de sodio, con las siguientes características de calidad ( pH 6.4; cuenta viable de *E.coli* JMP 101 3.9 ufc/mL; cuenta viable de mesófilos 6.3 ufc/mL; C 17 y h° 64 en el día 9 de almacenamiento a 4 °C). Los resultados mostraron que la bacteriocina producida por *E. faecalis* MXVK22 en combinación con LS, SP, y NS, puede ser usada como agente antimicrobiano natural dentro de una tecnología de barreras.

La vida de anaquel de la hamburguesa de carne de ovino a 4 °C es de 20 días, siendo la variable limitante el  $\Delta E$  de color, la vida de anaquel de marinado de carne de ovino a 4 °C es de 11 días, siendo la variable limitante la cuenta viable de mesófilos, la vida de anaquel de birria de carne de ovino enlatada. De acuerdo a lo reportado es un tiempo aceptable.

**REFERENCIAS**

1. Abriouel, H., Lucas, R., Ben, O.N., Valdivia, E., Maqueda, M., Martínez-Cañamero, M. y Gálvez, A. 2005. Enterocin AS-48RJ: a variant of enterocin AS-48 chromosomally encoded by *Enterococcus faecium* RJ16 isolated from food. *Systematic and Applied Microbiology*, 28: 383-397.
2. Álvarez, J. 2006. Color. Cap 6. En *Ciencia y Tecnología de Carnes*. Hui, H., Guerrero, I. y Rosmini, M. Edit. Limusa. México. p. 161-185.
3. Aymerich, T., Holo, H., Havarstein, L.S., Hugas, M., Garriga, M. y Nes, I.F. 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1676-1682.
4. Badui, D.S. 1999. *Química de los alimentos*. Pearson Educación. México. p 35,462-471.
5. Bell, R. G. (2001). Meat packaging: Protection, preservation and presentation. In Y. H. Hui, W. -K. Nip, R. W. Rogers, & O. A. Young (Eds.), *Meat Science and Applications*. N. York: Marcel Dekker, Inc. (pp. 463–490).
6. Berruga, M. I., Vergara, H., & Gallego, L. (2005). Influence of packaging on microbial and lipid oxidation in lamb meat. *Small Ruminant Research*, 57, 257–264.
7. Bhunia, A.K., Johnson, M.C., Ray, B. y Kalchayanad, N. 1991. Mode of action of pediocin AcH on sensitive bacterial strains. *Journal of Applied Bacteriology*, 70: 25-33.
8. Bourgeois, C.M., Mescle, J.F. and Zucca J. 1994. *Microbiología Alimentaria 1. Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria*. Editorial Acribia, S.A. p.17-33, 247-258,423-433.
9. Branen, A.L. and Haggerty, R.J. 2002. Introduction to food additives, in *Food Additives*, 2<sup>nd</sup> ed., Branen A.L., Davidson, P.M., Salminen, S., and Thomgate, J. H., Eds., Marcel Dekker, New York, p. 1-9; 563
10. Brijesh, K.T., Vasilis P.V., Colm P.O., Kasiviswanathan M., Bourke P., and Cullen P.J. 2009. Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation. *J. Agric. Food Chem*, 57, 5987-6000

11. Bourgeois, C.M., Mescle, J.F. and Zucca J.1994. *Microbiología Alimentaria 1. Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria*. Editorial Acribia, S.A. p.17-33, 247-258,423-433.
12. Buncic, S., Fitzgerald, S., Bell, C.M., Hudson, R.G., 1995. Individual and combined listericidal effects of sodium lactate, potassium sorbate, nisin and curing salts at refrigeration temperatures. *Journal of Food Safety* 15,247–264
13. Chen, N., y Shelef, A. 1992. Relation between water activity, salts of lactic acid and growth of *Listeria monocytogenes* in a meat model system. *Journal of Food Protection*, 55, 574–578.
14. Chen, H. y Hoover, D.G. 2003. Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Technology*, 2: 82-99.
15. Chikindas M.L, García-Garcera M.J., Driessen A.J.M., Ledebøer M.A., Nissen-Meyer J., Nes I.F., Abee T., Konings W.N. y Venema G. 1993. Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 59 (11): 3577–3584.
16. Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. y Chikindas, M.L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71: 1-20.
17. Cubina, I. 2001. Natural sodium and potassium lactates, the versatile ingredients for the meat and fish industry, p109-117.
18. Davidson P.M., Sofos N.J., and Branen A.L. 2005 Food antimicrobials. In: *Antimicrobials in Food*. P. 1-7,49-55,169-175, 269
19. Debevere, J. M. (1989). The effect of sodium lactate on the shelf-life of vacuum-packed coarse liver pâté. *Fleischwirtschaft*, 69, 223–224.
20. Deegan L.H., Cotter P.D., Colin H. and Ross P. 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*. 16, 1058-1071
21. Debevere, J. M. (2000). Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: addition of Na-lactate as a fourth shelf life determinative factor in a model and product validation. *International Journal of Food Microbiology*, 58, 93–106.

22. Devlieghere, F., Geeraerd, A. H., Versyck, K. J., Bernaert, H., Van Impe, J. F., & Frazier W.C., Westhoff D.C.1993. Microbiología de los alimentos. En alimentos y microorganismos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España. p. 3-20,191-199
23. Einarsson, H., Ericksson, S.G. 1986. Microbial growth models for prediction of shelf life of chilled meat. Recent Advances and Developments in the Refrigeration of Meat by Chilling International Institute of Refrigeration, París, France, pp 397-402.
24. Friedrich, L., Siro, I., Dalmadi, I., Horváth, K., Ágoston, R., Balla, Cs.2008. Influence of various preservatives on the quality of minced beef under modified atmosphere at chilled storage. *Meat Science*,79, 332-343
25. FOCUS, *Processed Fresh Meats*, PURAC, 2000.
26. Gálvez A., Hikmate A., López L.R. and Nabil B. O. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*. 10,1016-1046
27. García, M.T., BenOmar,N., Lucas, R., Pérez-Pulido, R., Castro, A.,Grande,M.J., Martínez-Cañamero,M., Gálvez,A., 2003. Antimicrobial activity of enterocin EJ97 on *Bacillus coagulans* CECT 12. *Food Microbiology* 20, 533–536.
28. Geesink, G.H., Bekhit, A.D. y Bickerstaffe, R. 2002. Rigor temperature and meat quality characteristics of lamb longissimus muscle. *J Anim Sci* 78, 2842-2848
29. Giannuzzi, L., Pinotti, A., Zaritzky, N. 1998. Mathematical modelling of microbial growth in packaged refrigerated beef stored at different temperatures. *Int. J. Food Microbiol.*, 39, 101–110.
30. Gill, C.O. 1983. Meat spoilage and evaluation of the potential storage life of fresh meat. *Journal of Food Protection* 46:444-452
31. Gill, C.O., Jones, T., 1992. Assessment of the hygienic efficiency of two commercial processes for cooling pig carcasses. *Food Microbiol.*, 9, 335–343.
32. Gill, C.O., Phillips, D.M., Hoeffen, M.P.F., 1988. A computer program for assessing the remaining storage life of chilled red meats from product temperature histories. In: *Proceeding of Meetings of Commissions C2, D1, D2/3, E1*, September 5–9, Institute International du Froid Paris, Refrigeration for Food and People, pp. 73–77.

33. Gracey, J.F. 1981. Thornton's meat hygiene. Tindall Editorial. Londres. Jay, J.M.; y Shelef, L.A. 1976. Microorganisms on meat proteins at low temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24:1113-1116
34. Greer, G. (1982). Mechanism of beef shelf life extension by sorbate. *Journal of Food Protection*, 45, 82–83.
35. Greer, G. 1988. Meat. In *Enzymes of psychrotrophs in raw food*. Mckellar R.C., Editor Boca Raton: CRC Press. Inc. 1989. p. 267-292
36. Greer, G., & Dilts, B. (1992). Factors affecting the susceptibility of meatborne pathogens and spoilage bacteria to organic acids. *Food Research International*, 25, 355–364.
37. Hoover, D. y Steenson, L. 1993. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Academic Press. pp. 1-6, 23-37, 41-48.
38. Houtsma, P. C., de Wit, J. C., Rombouts, F. M. (1993). Minimum inhibitory concentration (MIC) of sodium lactate for pathogens and spoilage organisms in meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 20, 247–257.
39. Hutchings, J. B. 1994. Food colour and appearance. Blackie Academic and Professional. Great Britain. p.406-408.
40. Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B., 1995. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiological Reviews* 59, 171–200.
41. Jay, J.M. 1987. *Modern Food Microbiology*, Van Nostrand Reinhold. Signorini Porchietto M.L. 2002, Efecto de la fermentación lactic sobre propiedades funcionales de las proteínas cárnicas, Tesis de Doctorado en Biotecnología
42. Jay, J.M. 1967. Nature, characteristics, and proteolytic properties of beef spoilage bacteria at low and high temperatures. *Applied Microbiology* 15:943-944
43. Jensen, J. M., Robbins, K. L., Ryan, K. J., Homco-Ryan, C., McKeith, F. W., & Brewer, M. S. (2003). Effects of lactic and acetic acid salts on quality characteristics of enhanced pork during retail display. *Meat Science*, 63, 501–508.
44. Karabagias, A., Badeka, A., y Kontominas, M.G. 2011. Shelf life extension of lamb meat using thyme or regano essential oils and modified atmosphere packaging. *Meat Science. In Press*
45. Katla T., Netersatd K., Vancanneyt M., Swings J. y Axelsson L. 2003. Differences in susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to Sakacin P, Sakacin A,

- Pediocin PA-1, and Nisin. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (8): 4431–4473.
46. Knock, R. C., Seyfert, M., Hunt, M. C., Dikeman, M. E., Mancini, R. A., Unruh, J. A., et al. (2006a). Effects of potassium lactate, sodium chloride, and sodium acetate on surface shininess/gloss and sensory properties of injection-enhanced beef strip-loin steaks. *Meat Science*, 74, 319–326.
47. Knock, R. C., Seyfert, M., Hunt, M. C., Dikeman, M. E., Mancini, R. A., Unruh, J. A., et al. (2006b). Effects of potassium lactate, sodium chloride, sodium tripolyphosphate, and sodium acetate on colour, colour stability, and oxidative properties of injection-enhanced beef rib steak. *Meat Science*, 74, 312–318.
48. Labuza, T.P., 1994. Determination of the Shelf Life of Foods. Article inedited.
49. Labuza, T.P., Fu, B. 1993. Growth kinetics for shelf-life predictions: theory and practice. *J. Ind. Microbiol.*, 12, 309–323.
50. Labuza, T.P., Fu, B., Taoukis, P.S. 1992. Prediction of shelf life and safety of minimally processed CAM/MAP chilled foods: a review. *J. Food Protection*, 55, 743–750.
51. Labuza, T.P., Riboh, D. 1982. Theory and applications of Arrhenius kinetics to the prediction of nutrient losses in foods. *Food Technology*, 36, 66–74.
52. McDonald, K., Sun, D-W. 1999. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 52, 1–27.
53. Mac Dougall, D.B. 1981. Changes in the colour and opacity of meat. Meat Research Institute, Langford, Bristol, Great Britain.
54. Nykänen, A., Weckman, K., Lapveteläinen, A., 2000. Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked rainbow trout by nisin and sodium lactate. *International Journal of Food Microbiology* 61, 63–72.
55. Lawrie, R.A. 1982. *Meat Science* Pergamon Press. Londres, Inglaterra.
56. Leistner, L., Gorris, L.G.M., 1995. Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science and technology* 6, 41-46.
57. Leistner, L. y Gould, G.W. 2002. Hurdle technologies. Combination treatments for food stability, safety and quality. New York, USA, Kluwer Academic/Plenum Publishers.

58. Long, C., Phillips, C.A., 2003. The effect of sodium citrate, sodium lactate and nisin on the survival of *Arcobacter butzleri* NCTC 12481 on chicken. *Food Microbiology* 20, 495–502.
59. Mc Meekin, T.A. 1981. Microbial spoilage of meats. En: *Developments in Food Microbiology*. R. Davies (Ed.). Applied Science. Londres, Inglaterra
60. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-034-SSA1-1993, Bienes y Servicios. Productos de la Carne. Carne Molida y Carne Molida Moldeada. Envasadas. Especificaciones Sanitarias.
61. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-1992-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa.
62. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-110-SSA1-1994 Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.
63. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-113-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de Microorganismos Coliformes Totales en Placa.
64. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-213-SSA1-2002, Productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
65. Parish, M: E., Davidson, P.M., 1993. Methods for evaluation. In: Davidson, P.M., Branen, A.L. (Eds.), *Antimicrobials in Foods*, 2<sup>nd</sup> ed. Marcel Dekker, New York, NY, pp. 597-615.
66. Price, J.F. y Schweigert, B.S.1994. *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España. p93-94.
67. Ray, B., 2002. High hydrostatic pressure: microbial inactivation and food preservation. In: Britton, G. (Ed.), *The Encyclopedia of Environmental Microbiology*. Wiley, New York, pp. 1552–1563
68. Rayman, K., Aris, B., Hurst, A., 1981. Nisin: possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats. *Applied and Environmental Microbiology* 41, 375–380.
69. Rayman, K., Malik, N., Hurst, A., 1983. Failure of nisin to inhibit outgrowth of *lostridium botulinum* in a model cured meat system. *Applied and Environmental Microbiology* 46, 1450–1452.
70. SAGARPA, 2007-2012. Programa Nacional Pecuario.

71. Sallam, K. I., y Samejima, K. (2004). Microbiological and chemical quality of ground beef treated with sodium lactate and sodium chloride during refrigerated storage. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 37, 865–871.
72. Scannell, A.G.M., Hill, C., Buckley, D.J., Arendt, E.K., 1997. Determination of the influence of organic acids and nisin on shelf-life and microbiological safety aspects of fresh pork sausage. *Journal of Applied Microbiology* 83, 407–412.
73. Schillinger, U. y Lucke, F.K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 1901-1906.
74. Sofos, J.N., Beuchat, L.R., Davidson, P.M., Johnson, E.A., 1998. Naturally occurring antimicrobials in food. Task Force Report No. 132. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, IA. 103pp
75. Stekelenburg, F. K. (2003). Enhanced inhibition of *Listeria monocytogenes* in Frankfurter sausage by the addition of potassium lactate and sodium diacetate mixtures.. *Food Microbiology*, 20, 133–137.
76. Taylor, J.I., Somer, E.B., Kruger, L.A., 1985. Antibotulinal effectiveness of nisin-nitrite combinations in culture medium and chicken frankfurter emulsions. *Journal of Food Protection* 48, 234–249.
77. Tan, W., y Shelef, L. A. (2002). Effects of sodium chloride and lactates on chemical and microbiological changes in refrigerated and frozen fresh ground pork. *Meat Science*, 62, 27–32.
78. Ukuku, D.O., Fett, W.F., 2004. Effect of nisin in combination with EDTA, sodium lactate, and potassium sorbate for reducing *Salmonella* on whole and fresh-cut cantaloupe. *Journal of Food Protection* 67, 2143–2150.
79. Varnam A.H. y Sutherland J.P. 1995. *Meat and Meat Products Technology, Chemistry and microbiology*. Chapman & Hall. 1,22,26, 131,153-165,374
80. Vaudagna S.; Lasta J; Sanchez G. 2006. Nuevas Tecnologías. Cap 19. En *Ciencia y Tecnología de Carnes*. Hui, H., Guerrero, I. y Rosmini, M. Edit. Limusa. México. p. 585
81. Wood, J. D., Enser, M., Fisher, A. V., Nute, G. R., Richardson, R. I., & Sheard, P. R. (1999). Manipulating meat quality and composition. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 58, 363–370.

82. Zamora, M., y Zaritzky, N.1987. Potassium sorbate inhibition of micro-organisms growing on refrigerated packaged beef. *Journal of Food Science*, 52, 257–262.
83. Zamudio Maya, M. 2006. Microorganismos patógenos y alternates Cap 11. En *Ciencia y Tecnología de Carnes*. Hui, H., Guerrero, I. y Rosmini, M. Edit. Limusa. México. p. 337, 360 y 361

## ANEXOS

## ANEXO 1

## Medios de cultivo utilizados

**Agar Eosina Azul de Metileno (EAM)**

(Bioxon Becton Dickinson, México S.A. De S.V.)

**Fundamento**

Se utiliza como medio selectivo y diferencial para el aislamiento de enterobacterias Gram negativas, el azul de metileno inhibe las bacterias Gram positivas. La eosina es un colorante que responde a los cambios de pH, virando de incoloro al negro en condiciones de acidez, contiene además lactosa y sacarosa en altas concentraciones. Las bacterias Gram-positivas resultan ampliamente inhibidas en su crecimiento, gracias a los colorantes presentes en la formulación, la cual se muestra en la tabla 8. Enseguida, en la tabla 9, se observan las características morfológicas que presentan las enterobacterias en este medio.

Tabla 8. Componentes de la formulación para el medio EAM.

Compuesto	g/L
Peptona	10
hidrogeno fosfato dipotásico	2,0
lactosa	5,0
sacarosa	5,0
Eosina amarillenta	0,4
Azul de metileno	0,07
Agar Agar	13.5

Tabla 9. Características morfológicas de enterobacterias.

microorganismos	Características morfológicas
<i>Salmonella, shigelia.</i>	Transparentes de color ámbar
<i>Escherichiacoli.</i>	Verdosas con brillo metálico a la luz reflejada, con el centro negro azulado a la luz transmitida
<i>Enterobacter, Klebsiella.</i>	Más grandes que I E. coli, mucosas, confluentes, con el centro pardo-grisáceo a la luz transmitida.

## Agar para cuenta estándar(CE)

(BD BioxonBectonDickinson de México SA de SV)

### Fundamento

Este medio se utiliza para el recuento de bacterias aeróbicas a partir de agua, aguas residuales, alimentos y productos lácteos. Se formula con los ingredientes originales, como se muestra en la tabla 10. El extracto de carne y la peptona de caseína han sido utilizados en medios diseñados para estudiar la presencia de microorganismos termofílicos en productos lácteos y cárnicos, además de proporcionar la fuente de carbono y nitrógeno. La dextrosa es el carbohidrato fermentable y el agar es adicionado como agente solidificante.

**Tabla 10. Componentes de la formulación para el medio CE**

Compuesto	g/L
<b>Extracto de carne</b>	3,0
<b>Peptona de caseína</b>	5,0
<b>Cloruro sódico</b>	5,0
<b>Dextrosa</b>	1,0
<b>Agar-agar</b>	12,0

## A

I - 9

Editado / Edited XI - 2002

## Fundamento

Por la presencia simultánea de violeta cristal y sales bilia- res se asegura en gran parte la inhibición de la flora acompañante. La degradación de la glucosa a ácido se pone de manifiesto por el cambio de color del indicador. La presencia de halo en estas colonias corresponde a un precipitado biliar.

La mayoría de organismos que presentan estas característi- cas son Enterobacterias, sin embargo no es completamen- te específico, por ejemplo, las Aeromonas se comportan de forma similar.

Fórmula (por litro)

Mezcla de Sales Biliares..... 1,5

g Violeta Cristal.....

0,002 g Rojo Neutro..... 0,03 g D(+)-Glucosa..... 10,0

g

Extracto de Levadura..... 3,0

g

Peptona de Gelatina..... 7,0

g

Sodio Cloruro..... 5,0

g

Agar..... 15,0

g

pH final: 7,4 ± 0,2

## Preparación

Suspender 41,5 g en 1 l de agua destilada; calentar y agi- tar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. Dejar enfriar a 45°C y emplear de inmediato. Se puede esterilizar con cui- dado (30 minutos vapor fluente, por ejemplo).  
NO ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE.

## Modo de empleo

Transferir 1 ml de la muestra a analizar y 1 ml de sus suce- sivas diluciones a tantas placas como correspondan. Con el medio enfriado a una temperatura entre 45° y 48°C, añadir a cada placa 15 ml del medio líquido. Homogeneizar giran- do lateralmente las placas en un sentido y otro. Dejar enfriar hasta solidificación. Añadir a cada placa 10 ml más del medio líquido y volver a dejar solidificar. Al haber asegurado la anaerobiosis no tendrá lugar el crecimiento de bacterias Gram- negativas no fermentadoras. Incubar a 37°C durante 24 horas. La formación de colonias de color púrpura viole- ta, rodeadas de un halo del mismo color, indica presencia de Enterobacterias.

## Control físico-químico

Aspecto: polvo fino.

Solubilidad: total.

Color:

beige rojizo.

pH: 7,4 ± 0,2

## Control microbiológico

Los siguientes resultados fueron obtenidos a partir de cepas patrón, después de incubación a temperatura de 37°C y observados a las 24 horas.

Microorganismos

Desarrollo

Color de la Colonia

Escherichia coli ATCC 11775

Satisfactorio

Roja

Salmonella gallinarum NCTC 9240

Satisfactorio

Roja

Shigella flexneri ATCC 29903

Satisfactorio

Roja

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Inhibido

—

Streptococcus lactis ATCC 19435

Inhibido

—

**Bibliografía**

J. Bact.,84: 381 (1962)

J. Appl. Bact.,26: 444-452 (1963)

**Control de calidad**

**Medio caldo caseína-glucosa (CCG) para el cultivo de *Enterococcus sp.*****Tabla 11 Componentes de la formulación del medio CCG**

compuesto	gramos por litro
<b>Peptona biotriptasa</b>	20
<b>Glucosa</b>	10
<b>Extracto de levadura</b>	5
<b>Citrato de amonio</b>	2
<b>Fosfato di sódico</b>	2
<b>Sulfato de magnesio</b>	0.1
<b>Sulfato de manganeso</b>	0.05
<b>Tween 80</b>	1 ml
<b>pH</b>	7

## Agar Mc CONKEY

### Fundamento

Es un medio selectivo utilizado para el aislamiento de *Salmonellas*, *Shigellas* y bacterias *coliformes*. Las sales biliares y el violeta cristal inhiben considerablemente la flora Gram-positiva. La lactosa, junto con el indicador de pH, rojo neutro, sirve para la comprobación de la degradación de dicho azúcar. Formulación de éste medio se muestra en la tabla 12, así como también las características morfológicas que muestran las colonias cultivadas (tabla 13).

Tabla 12. Formulación del medio Mc Conkey.

Composición	g/L
Peptona de caseína	17,0
Peptona de carne	3,0
Cloruro sódico	5,0
Lactosa	10,0
Mezcla de sales biliares	1,5
Rojo neutro	0,03
Violeta cristal	0,001
Agar-agar	13,5

Tabla 13. Características morfológicas de las bacterias en Agar Mc Conkey.

Microorganismos	Características de las colonias
<i>Salmonella Shigella</i> y otros.	Incoloras transparentes.
<i>Escherichiacoli</i> .	Grandes, rojas, halo turbio.
<i>Enterobacter, Klebsiella</i> .	Grandes rosadas, mucosas.

---

***Enterococos, Estafilococos y otros.***Diminutas de crecimiento aislado, opacas.

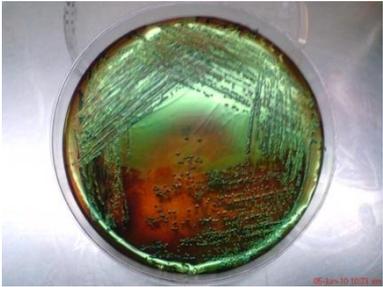
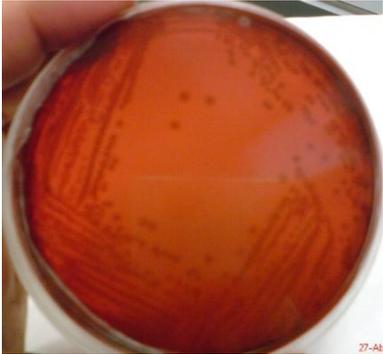
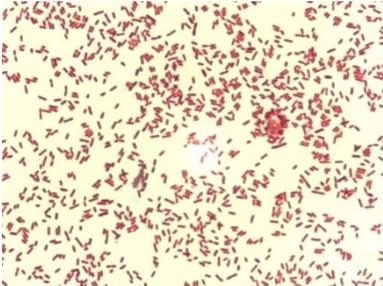
---

## ANEXO 2

### **Técnica empleada para determinar la pureza de las cepas.**

Para realizar la comprobación de la pureza de la cepa, de *Escherichia coli* JMP 101 se sembró en el medio EAM, el cual se utiliza como medio selectivo y diferencial para el aislamiento de enterobacterias Gram negativas, el azul de metileno inhibe las bacterias Gram positivas, la eosina es un colorante que responde a los cambios de pH, virando del incoloro al negro en condiciones de acidez, contiene además lactosa y sacarosa en altas concentraciones, ya que las bacterias entéricas son fermentadoras de lactosa o sacarosa, al acidificar el medio, las colonias pueden tomar coloraciones que van desde tonos rojizos para las que fermentan sacarosa como *Salmonella*, *Shigella* y *Pseudomonas*, o las que muestran un color violáceo, con un brillo verdoso-metálico, como *E.coli* JMP 101 que fermenta lactosa, en la tabla 14, se puede observar la morfología de las colonias de *E.coli* JMP 101 y la tinción de Gram que dio negativo, ya que las colonias tuvieron una coloración roja debido a que la pared celular de las bacterias Gram<sup>-</sup>, contiene un bajo porcentaje de péptidoglucano (aproximadamente 10 %) que una vez que se ha teñido con el complejo colorante violeta-yodo, se procede a desteñir con alcohol, debido a que la capa externa es rica en lípidos, además de que la capa delgada del péptido glucano no impide el paso al solvente, en el caso de las bacterias Gram (‘+) el alcohol deshidrata a las células cerrándose los poros ya que posee una pared gruesa de peptidoglucano 90 %.

Tabla 14. Características morfológicas de E.coli JMP 101, en agar EAM y Mc Conkey.

Microorganismo reto	Características morfológicas	CAJA PETRI
<i>Escherichia coli JMP 101</i>	<p>EAM</p> <p>Centro oscuro con brillo metálico grisáceo</p>	
	<p>MC</p> <p>Colonias grandes rojas o rosas con halo turbio</p>	
	<p>Bacteria Gram negativa, tiene forma de bacilos, con tamaño 1.1-1.5 x 2-6 μm.</p>	

## ANEXO 3

**Elaboración de birria de cordero enlatada**

La Birria es un platillo tradicional originario de Jalisco, el principal ingrediente es la carne de chivo marinada con especias, como son: pimienta, tomillo, ajo, orégano, jengibre, ajonjolí, mejorana, jitomate y cebolla, incluidas en la salsa. Los chiles que componen la salsa son de árbol, ancho y pasilla, acompañados de hojas de laurel y sazónador, éste platillo se cocinada al horno.

La birria se elaboró en la planta piloto de tecnología de carnes en la UAM-Iztapalapa, de acuerdo a la formulación mostrada en la tabla 15, primero se seleccionó la carne conforme a lo que establece las normas NOM-033-ZOO-1995, NOM-008-ZOO-1994, NOM-009-ZOO-1994 y NOM-004-ZOO-1996. Se procedió al deshuese de la misma, posteriormente se cortó en trozos pequeños aproximadamente de entre 3 a 5 centímetros, la carne perfectamente limpia se pesó, junto con los demás ingredientes tanto para el marinado como para de la salsa. Para la preparación de la salsa se retiraron las semillas y las venas de los chiles, se escaldaron después se realizó la molienda los chiles, una vez molidos se mezclaron con el vinagre y las especias, se procedió al marinado. Por otra parte se preparó el puré de tomate el cual se mezcló con el consomé con agua purificada, se realizó una cocción de 10 minutos a 90 °C. La carne con la salsa se precocieron por 35 min a 90°C, después se agregó el caldillo, para finalmente realizar la cocción de la mezcla por otros 30 minutos.

**Tabla 15.Fórmula para la birria de cordero enlatada**

<b>Ingredientes</b>	<b>g/kg</b>	<b>%</b>	<b>Función</b>
<b>Carne</b>	269	27	Materia prima principal
<b>Marinado ( mezcla de chiles y</b>	<u>730</u>	73	<u>Sabor y aroma</u>

<b>especias)</b>			
<b>EDTA</b>	0.075*	0.01	Antioxidante
<b>Citrato de sodio</b>	0.5**	0.05	Antioxidante
<b>TOTAL</b>	1000	100	

\* La Norma NOM-130-SSA1-1995 establece un límite máximo de 75mg/kg y el LD<sub>50</sub> en ratas es de 2.0- 2.2 g/kg

\*\* Está regulado por las BPF (Buenas prácticas de fabricación).

Las latas una vez sanitizadas fueron llenadas manualmente con la birra, una vez llenas, se pasaron por un exhaustor, el vapor elimino el aire del espacio de cabeza de la lata, controlando la temperatura del vapor de 80 °C. Se procedió al engargolado de las latas por medio de una engargoladora, finalmente se les dio un tratamiento térmico a 145 °C por 1 hora, para garantizar la calidad microbiológica del producto.

### Elaboración de Fajitas marinadas de carne de ovino.

Para tener una visión sobre lo que es el marinado, lo que establece la norma oficial mexicana NOM-213-SSA1-2002 para “productos cárnicos marinados” como aquellos que son adicionados de sal u otros aditivos por vía seca o húmeda excepto nitratos o nitritos, pudiendo ser cocidos o no. De acuerdo a lo anterior las fajitas se elaboraron a partir de cortes de carne de ovino, la cual se sometió a un proceso de masajeado, con una mezcla de fosfatos, agua y especias, según la formulación mostrada en la tabla 16, posteriormente se empacó al vacío y sometió a un proceso de refrigeración.

**Tabla 16. Formulación de fajitas marinadas de carne de ovino.**

<b>Ingredientes</b>	<b>%</b>	<b>Función</b>
Carne de ovino (Pierna)	63.50	Materia prima principal
Agua	30	Disolver ingredientes
Sal	2	Mejora el sabor y ayuda a ligar la solución a la carne
Fosfato	2	Retiene el agua en la carne y tiene propiedad antioxidante
Sabor (pimienta negra y ajo deshidratado)	2	Dar sabor
Carragenina	0.50	Retención de agua
<b>TOTAL</b>	<b>100%</b>	

### Elaboración de hamburguesas de carne de ovino

La definición de hamburguesa según la norma NOM-034-SSA1-1993 es “Carne molida moldeada envasada, al producto obtenido de la carne fresca de animales de los géneros Bos, Suis, Ovis, Gallus, procedente de rastros que cumplan con lo establecido en el reglamento, que es cortada y pasada por un molino o picadora, moldeada, envasada y conservada para su venta al público”. El producto se elaboró de acuerdo a la formulación mostrada en la tabla 17. La formulación es porcentual para un kilogramo de producto.

**Tabla 17. Formulación de la hamburguesa de carne de ovino..**

<b>Ingredientes</b>	<b>%</b>	<b>g/Kg</b>	<b>Función</b>
Carne de Cordero (Pierna)	45	450	Materia prima principal
Lardo	15	150	Sabor
Soya texturizada e hidratada	15	150	Agente extensor
Agua	11	110	Mejora rendimiento, da textura al producto
Concentrado de proteína de soya en polvo	10	100	Agente extensor
Sal	0.5	5	Sabor, cohesividad
Colorante (Rojo carmín)	0.5	5	Color
Cebolla deshidratada	0.5	5	Sabor
Ajo deshidratado	0.5	5	Sabor
Mezcla de especias (Pimienta, comino y sazónador)*	0.5	5	Aroma y sabor
Glutamato Monosódico	0.5	5	Potenciador de sabor
Agente antimicrobiano (Esteribac-101)	0.5%	5	Inhibe el crecimiento de microorganismos
Antioxidante (Citrato Sódico)	0.5%	5	Retarda oxidaciones y estabiliza el color.
<b>TOTAL</b>	<b>100%</b>	<b>1000</b>	

T

### Hamburguesa comercial

Marca: **Su Carne**

Ingredientes: Carne de res, condimentos, especias y hierbas aromáticas.

Manténganse en congelación a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

8 Piezas Cont. Neto 760 gr.

#### Información Nutricional

Tamaño porción: 1 pieza (95g)

Porciones por envase: 8

Tabla 18 Información nutricional

Contenido energético	220 kcal
Grasa	<b>119 kcal</b>
valor diario	<b>%</b>
Grasa saturada 4.5 g	<b>22</b>
Colesterol 80 mg	<b>26</b>
Sodio 63 mg	<b>3</b>
Carbohidratos totales	<b>0</b>
Calcio	<b>2</b>
Hierro	<b>14</b>
Niaciana	<b>28</b>
Vitamina B12	<b>45</b>

## ANEXO 4

## Análisis de varianza (ANDEVA)

## Sorbato de potasio

## Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Mesofilos

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
	a				
Concentracion	26.360	24	1.098	45.219	.000
Dias	35.975	3	11.992	493.705	.000
Concentracion * Dias	57.059	72	.792	32.627	.000
Error	2.429	100	.024		
Total	7337.190	200			
Total corregida	121.822	199			

a. R cuadrado = .980 (R cuadrado corregida = .960)

## Mesofilos

Tukey B<sup>a,b</sup>

Concentracion	N	Subconjunto											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
15.00	8	4.9100											
13.00	8		5.3063										
55.00	8		5.4938	5.4938									
14.00	8			5.5838	5.5838								
11.00	8				5.7838	5.7838							
22.00	8					5.8550							
54.00	8					5.8650							
35.00	8						5.9013						
12.00	8					5.9313	5.9313	5.9313					
23.00	8					5.9888	5.9888	5.9888	5.9888				
24.00	8					5.9963	5.9963	5.9963	5.9963				
25.00	8					6.0075	6.0075	6.0075	6.0075	6.0075			
32.00	8					6.0413	6.0413	6.0413	6.0413	6.0413	6.0413		
21.00	8						6.1563	6.1563	6.1563	6.1563	6.1563	6.1563	
45.00	8							6.1900	6.1900	6.1900	6.1900	6.1900	6.1900
42.00	8								6.2225	6.2225	6.2225	6.2225	6.2225
34.00	8									6.2663	6.2663	6.2663	6.2663
31.00	8									6.2688	6.2688	6.2688	6.2688
44.00	8									6.2688	6.2688	6.2688	6.2688
52.00	8										6.2975	6.2975	6.2975
43.00	8										6.3075	6.3075	6.3075
51.00	8										6.3075	6.3075	6.3075
41.00	8											6.3338	6.3338
33.00	8												6.4013
53.00	8												6.4563

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = .024.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

b. Alfa = .05.

## Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: E.coli

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
	a				
Concentracion	25.984	24	1.083	48.735	.000
Dias	101.435	3	33.812	1521.980	.000
Concentracion * Dias	78.648	72	1.092	49.170	.000
Error	2.222	100	.022		
Total	6017.307	200			
Total corregida	208.288	199			

a. R cuadrado = .989 (R cuadrado corregida = .979)

## E.coli

Tukey B<sup>b</sup>

Concentracion	N	Subconjunto													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			
31.00	8	4.6813													
55.00	8	4.8300	4.8300												
43.00	8		4.9325	4.9325											
34.00	8		4.9763	4.9763	4.9763										
42.00	8			5.0713	5.0713	5.0713									
52.00	8				5.1763	5.1763	5.1763								
51.00	8				5.2013	5.2013	5.2013								
25.00	8				5.2088	5.2088	5.2088								
41.00	8					5.2288	5.2288								
15.00	8					5.2350	5.2350								
33.00	8					5.2350	5.2350								
35.00	8					5.2650	5.2650								
32.00	8					5.2713	5.2713								
21.00	8						5.3488	5.3488							
23.00	8						5.4150	5.4150	5.4150						
14.00	8							5.5675	5.5675	5.5675					
44.00	8							5.5713	5.5713	5.5713					
13.00	8								5.6250	5.6250					
45.00	8									5.6638					
11.00	8									5.7025	5.7025			5.7025	
22.00	8									5.7375	5.7375			5.7375	
54.00	8									5.7850	5.7850			5.7850	
53.00	8										5.9138			5.9138	
24.00	8										5.9300			5.9300	
12.00	8														6.1613

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = .022.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

b. Alfa = .05.

## Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Coliformes

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
	a				
Dias	37.088	3	12.363	399.003	.000
Concentracion	37.759	24	1.573	50.778	.000
Dias * Concentracion	108.100	72	1.501	48.458	.000
Error	3.098	100	.031		
Total	7432.800	200			
Total corregida	186.044	199			

a. R cuadrado = .983 (R cuadrado corregida = .967)

## Coliformes

Tukey B<sup>a,b</sup>

Concentracion	N	Subconjunto					
		1	2	3	4	5	6
15.00	8	4.9200					
21.00	8		5.2750				
31.00	8		5.3575				
14.00	8		5.4738				
13.00	8			5.7425			
35.00	8			5.7475			
12.00	8			5.7738	5.7738		
11.00	8			5.8313	5.8313		
44.00	8			5.8350	5.8350		
51.00	8			5.8713	5.8713		
25.00	8			5.8975	5.8975		
22.00	8				6.0475	6.0475	
43.00	8					6.1688	
32.00	8					6.2163	
24.00	8					6.2200	
55.00	8					6.2638	
23.00	8					6.2650	
34.00	8					6.2875	
45.00	8					6.2988	
33.00	8					6.3388	
54.00	8					6.3388	
42.00	8					6.3463	
53.00	8						6.6300
41.00	8						6.6400
52.00	8						6.7000

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = .031.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

b. Alfa = .05.

## Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: a

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Días	1979.876	3	659.959	15191.722	.000
Concentracion	482.912	24	20.121	463.177	.000
Días * Concentracion	1335.513	72	18.549	426.978	.000
Error	4.344	100	.043		
Total	19229.108	200			
Total corregida	3802.646	199			

a. R cuadrado = .999 (R cuadrado corregida = .998)

a

Tukey B<sup>b</sup>

Concentracion	N	Subconjunto													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
25.00	8	7.1425													
51.00	8	7.2125													
45.00	8	7.2850	7.2850												
54.00	8		7.5450	7.5450											
23.00	8		7.6025	7.6025											
33.00	8			7.6400											
52.00	8			7.6650											
41.00	8			7.6775											
34.00	8			7.7375	7.7375										
32.00	8			7.8250	7.8250	7.8250									
43.00	8			8.0175	8.0175	8.0175	8.0175								
42.00	8			8.0200	8.0200	8.0200	8.0200								
44.00	8				8.0850	8.0850	8.0850								
35.00	8				8.1375	8.1375	8.1375								
24.00	8						8.1925								
22.00	8							8.6025							
11.00	8								8.9175						
12.00	8									9.3425					
53.00	8									9.6375					
55.00	8										9.9300				
13.00	8											9.9300			
15.00	8												9.9300		
14.00	8													10.1050	
21.00	8														11.0375
31.00	8														11.7350
															12.0950
															12.3750

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.  
 Basado en la suma de cuadrados tipo III  
 El término error es la Media cuadrática (Error) = .043.  
 a. Usa el tamaño muestral de la media aritmética = 8.000

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: b

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
	a				
Días	604.214	3	201.405	14113.359	.000
Concentracion	136.058	24	5.669	397.259	.000
Días * Concentracion	264.141	72	3.669	257.077	.000
Error	1.427	100	.014		
Total	36080.455	200			
Total corregida	1005.840	199			

a. R cuadrado = .999 (R cuadrado corregida = .997)

b

Tukey B<sup>b</sup>

Concentracion	N	Subconjunto													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			
23.00	8	12.0025													
32.00	8	12.0725													
45.00	8	12.0775													
34.00	8		12.4650												
24.00	8			12.6850											
35.00	8			12.7500	12.7500										
52.00	8			12.7750	12.7750	12.7750									
25.00	8			12.7775	12.7775	12.7775									
42.00	8			12.8288	12.8288	12.8288	12.8288								
54.00	8				12.8975	12.8975	12.8975								
44.00	8				12.9100	12.9100	12.9100								
51.00	8					12.9550	12.9550								
43.00	8						13.0150								
33.00	8							13.2650							
55.00	8							13.2925							
11.00	8								13.5225						
41.00	8								13.5550						
53.00	8								13.5625						
15.00	8								13.5700						
22.00	8								13.6050						
12.00	8								13.6900						
13.00	8									14.0825					
14.00	8									14.1975					
31.00	8										14.9875				
21.00	8											14.9875			15.5300

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.  
 Basado en la suma de cuadrados tipo III  
 El término error es la Media cuadrática (Error) = .014.  
 a. Usa el tamaño muestral de la media aritmética = 8.000

## Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: L

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
	a				
Días	325.453	3	108.484	543.895	.000
Concentracion	370.720	24	15.447	77.443	.000
Días * Concentracion	576.460	72	8.006	40.141	.000
Error	19.946	100	.199		
Total	211141.559	200			
Total corregida	1292.578	199			

a. R cuadrado = .985 (R cuadrado corregida = .969)

L

Tukey B<sup>a,b</sup>

Concentracion	N	Subconjunto													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
45.00	8	29.7150													
23.00	8	30.2725	30.2725												
55.00	8		30.6550	30.6550											
52.00	8		30.7875	30.7875											
53.00	8		30.8488	30.8488											
32.00	8			31.1325											
22.00	8			31.3450											
42.00	8				32.0775										
25.00	8				32.0775										
35.00	8				32.2200	32.2200									
15.00	8				32.3700	32.3700	32.3700								
51.00	8				32.3925	32.3925	32.3925								
41.00	8				32.4475	32.4475	32.4475	32.4475							
24.00	8				32.5400	32.5400	32.5400	32.5400							
34.00	8				32.5525	32.5525	32.5525	32.5525							
54.00	8				32.6725	32.6725	32.6725	32.6725	32.6725						
21.00	8				32.8825	32.8825	32.8825	32.8825	32.8825	32.8825					
14.00	8						33.0450	33.0450	33.0450	33.0450	33.0450				
31.00	8							33.1850	33.1850	33.1850	33.1850	33.1850			
44.00	8								33.3425	33.3425	33.3425	33.3425	33.3425		
33.00	8									33.4750	33.4750	33.4750	33.4750		
13.00	8										33.7125	33.7125	33.7125	33.7125	
43.00	8											33.7975	33.7975	33.7975	33.7125
12.00	8													34.2300	
11.00	8														36.0250

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = .199.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

b. Alfa = .05.

## Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: cromaticidad

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
	a				
combinacion	390.006	24	16.250	418.756	.000
día	1751.695	3	583.898	15046.597	.000
combinacion * dia	931.110	72	12.932	333.250	.000
Error	3.881	100	.039		
Total	55308.396	200			
Total corregida	3076.691	199			

a. R cuadrado = .999 (R cuadrado corregida = .997)

## cromaticidad

Tukey B<sup>b</sup>

combinacion	N	Subconjunto										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
45.00	8	14.3463										
32.00	8		14.7888									
23.00	8		14.7988									
52.00	8		14.9488	14.9488								
51.00	8		15.0025	15.0025								
34.00	8		15.0613	15.0613								
54.00	8		15.1113	15.1113								
25.00	8			15.1275								
35.00	8				15.4438							
44.00	8				15.4750							
24.00	8				15.5238	15.5238						
42.00	8				15.5413	15.5413						
43.00	8				15.6400	15.6400						
33.00	8				15.7513	15.7513						
41.00	8					15.8238						
11.00	8						16.4100					
22.00	8						16.5925	16.5925				
12.00	8						16.6563	16.6563				
55.00	8						16.6775	16.6775				
53.00	8							16.7388				
13.00	8								17.4038			
15.00	8								17.5263			
14.00	8									18.4613		
31.00	8											19.4650
21.00	8											19.6950

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = .039.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

b. Alfa = .05.

## Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: tonalidad

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
	a				
combinacion	4199.435	24	174.976	450.250	.000
día	14000.376	3	4666.792	12008.594	.000
combinacion * día	10072.696	72	139.899	359.987	.000
Error	38.862	100	.389		
Total	726235.234	200			
Total corregida	28311.368	199			

a. R cuadrado = .999 (R cuadrado corregida = .997)

tonalidad

Tukey <sup>a</sup><sub>b</sub>

combinacion	N	Subconjunto													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
14.00	8	50.5175													
31.00	8	50.6250													
15.00	8	50.9213													
21.00	8		52.2263												
55.00	8			53.1538											
13.00	8				54.7763										
53.00	8				54.9875										
12.00	8					56.4863									
11.00	8						57.9200								
52.00	8							59.5575							
54.00	8								60.6538						
44.00	8								60.9900	60.9900					
32.00	8								61.5238	61.5238	61.5238				
24.00	8								61.6088	61.6088	61.6088	61.6088			
22.00	8								61.6325	61.6325	61.6325	61.6325			
43.00	8								61.7525	61.7525	61.7525				
35.00	8								61.8500	61.8500	61.8500				
42.00	8								61.8713	61.8713	61.8713				
51.00	8											62.1388			
45.00	8											62.2725	62.2725		
34.00	8											62.5988	62.5988		
41.00	8											62.9488	62.9488		
33.00	8												62.9488	63.7000	
23.00	8													63.7000	64.5038
25.00	8														65.6088

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = .389.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

b. Alfa = .05.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: pH

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
	a				
Días	129.685	3	43.228	7692.586	.000
Concentracion	10.646	24	.444	78.939	.000
Días * Concentracion	11.639	72	.162	28.766	.000
Error	.562	100	.006		
Total	9177.628	200			
Total corregida	152.532	199			

a. R cuadrado = .996 (R cuadrado corregida = .993)

## pH

Tukey B<sup>b</sup>

Concentracion	N	Subconjunto												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
15.00	8	5.9538												
14.00	8		6.4338											
41.00	8		6.4800											
13.00	8		6.4925	6.4925										
11.00	8		6.5475	6.5475	6.5475									
44.00	8			6.6025	6.6025	6.6025								
45.00	8				6.6163	6.6163								
51.00	8					6.6800	6.6800							
24.00	8					6.6888	6.6888							
12.00	8					6.7000	6.7000							
43.00	8					6.7100	6.7100	6.7100						
35.00	8						6.7413	6.7413	6.7413					
42.00	8						6.7613	6.7613	6.7613					
25.00	8						6.7713	6.7713	6.7713					
34.00	8						6.7738	6.7738	6.7738					
52.00	8						6.7775	6.7775	6.7775					
32.00	8						6.7900	6.7900	6.7900	6.7900				
23.00	8							6.8300	6.8300	6.8300	6.8300			
55.00	8							6.8325	6.8325	6.8325	6.8325			
33.00	8								6.8500	6.8500	6.8500			
54.00	8								6.8500	6.8500	6.8500			
53.00	8								6.8513	6.8513	6.8513			
22.00	8									6.9063	6.9063			
21.00	8													7.1450
31.00	8													7.1538

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = .006.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

b. Alfa = .05.

## Lactato de sodio

## Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Mesof ilos

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
	a				
Dias	138.062	3	46.021	1181.728	.000
Concentracion	103.663	24	4.319	110.912	.000
Dias * Concentracion	18.026	72	.250	6.429	.000
Error	3.894	100	.039		
Total	5557.748	200			
Total corregida	263.645	199			

a. R cuadrado = .985 (R cuadrado corregida = .971)

## Mesofilos

Tukey B<sup>b</sup>

Concentracion	N	Subconjunto										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
35.00	8	4.1700										
45.00	8	4.1938	4.1938									
55.00	8	4.2463	4.2463									
54.00	8	4.3375	4.3375	4.3375								
25.00	8	4.3538	4.3538	4.3538								
34.00	8	4.4638	4.4638	4.4638								
24.00	8		4.5200	4.5200								
44.00	8			4.6413	4.6413							
53.00	8				4.8600	4.8600						
43.00	8				4.8788	4.8788						
23.00	8				4.9038	4.9038						
22.00	8				4.9050	4.9050						
33.00	8				4.9200	4.9200						
52.00	8					4.9950						
42.00	8					5.0163						
32.00	8					5.0388						
11.00	8						5.5375					
15.00	8						5.6738					
14.00	8							5.6738				
13.00	8							5.8588	5.8588			
12.00	8							5.9575	5.9575	5.9575		
21.00	8								6.0863	6.0863	6.0863	6.0863
31.00	8								6.1563	6.1563	6.1563	6.1563
51.00	8									6.2688	6.2688	6.2688
41.00	8										6.3075	6.3075
												6.3338

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = .039.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

## Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: E.coli

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Días	52.078	3	17.359	876.294	.000
Concentracion	176.534	24	7.356	371.306	.000
Días * Concentracion	70.413	72	.978	49.367	.000
Error	1.981	100	.020		
Total	3877.387	200			
Total corregida	301.006	199			

a. R cuadrado = .993 (R cuadrado corregida = .987)

## E. coli

Tukey B<sup>b</sup>

Concentracion	N	Subconjunto									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
35.00	8	2.8050									
55.00	8		3.3425								
45.00	8		3.4038	3.4038							
25.00	8		3.4200	3.4200	3.4200						
44.00	8		3.5450	3.5450	3.5450	3.5450					
34.00	8		3.5563	3.5563	3.5563	3.5563					
32.00	8			3.6088	3.6088	3.6088	3.6088				
42.00	8			3.6163	3.6163	3.6163	3.6163				
33.00	8			3.6188	3.6188	3.6188	3.6188				
54.00	8				3.6500	3.6500	3.6500				
24.00	8					3.6625	3.6625				
23.00	8					3.6813	3.6813				
22.00	8					3.7238	3.7238				
52.00	8					3.7263	3.7263				
53.00	8					3.7288	3.7288				
43.00	8						3.8138				
31.00	8							4.6813			
51.00	8								5.2013		
41.00	8								5.2288	5.2288	
21.00	8								5.3488	5.3488	
15.00	8									5.4313	
13.00	8									5.4525	
11.00	8										5.7888
14.00	8										5.8238
12.00	8										5.8588

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = .020.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

b. Alfa = .05.

## Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Coliformes

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
	<sup>a</sup>				
Días	70.356	3	23.452	956.759	.000
Concentracion	196.329	24	8.180	333.729	.000
Días * Concentracion	60.422	72	.839	34.236	.000
Error	2.451	100	.025		
Total	4108.666	200			
Total corregida	329.558	199			

a. R cuadrado = .993 (R cuadrado corregida = .985)

## Coliformes

Tukey B<sup>a,b</sup>

Concentracion	N	Subconjunto												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
55.00	8	3.3575												
45.00	8	3.4513	3.4513											
25.00	8	3.4763	3.4763	3.4763										
53.00	8	3.4813	3.4813	3.4813										
43.00	8	3.4925	3.4925	3.4925										
34.00	8	3.5088	3.5088	3.5088	3.5088									
42.00	8	3.5400	3.5400	3.5400	3.5400	3.5400								
54.00	8	3.5675	3.5675	3.5675	3.5675	3.5675								
35.00	8	3.5750	3.5750	3.5750	3.5750	3.5750								
24.00	8	3.6063	3.6063	3.6063	3.6063	3.6063								
44.00	8		3.6863	3.6863	3.6863	3.6863								
32.00	8			3.7275	3.7275	3.7275								
22.00	8				3.7675	3.7675								
23.00	8					3.8050								
33.00	8						4.0725							
52.00	8						4.1025							
15.00	8							5.1700						
21.00	8							5.2750						
31.00	8							5.3575	5.3575					
14.00	8							5.3613	5.3613					
13.00	8								5.5775	5.5775				
12.00	8								5.5863	5.5863				
11.00	8									5.6163				
51.00	8										5.8713			
41.00	8											5.8713		6.6400

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = .025.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

b. Alfa = .05.

## Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: a

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Dias	368.073	3	122.691	461.913	.000
Concentracion	301.508	24	12.563	47.297	.000
Dias * Concentracion	536.952	72	7.458	28.077	.000
Error	26.562	100	.266		
Total	20368.643	200			
Total corregida	1233.094	199			

a. R cuadrado = .978 (R cuadrado corregida = .957)

a

Tukey B<sup>b</sup>

Concentracion	N	Subconjunto												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
51.00	8	7.2125												
41.00	8	7.6775	7.6775											
44.00	8		8.1375	8.1375										
45.00	8			8.5038	8.5038									
24.00	8			8.8200	8.8200	8.8200								
33.00	8			8.9150	8.9150	8.9150	8.9150							
15.00	8			8.9350	8.9350	8.9350	8.9350							
42.00	8				9.3375	9.3375	9.3375	9.3375		9.3375				
32.00	8					9.4000	9.4000	9.4000						
25.00	8					9.5600	9.5600	9.5600						
14.00	8					9.5725	9.5725	9.5725						
35.00	8					9.6075	9.6075	9.6075						
55.00	8						9.7575	9.7575						
54.00	8						9.7825	9.7825						
53.00	8							9.9725						
52.00	8								10.0100					
34.00	8								10.1550	10.1550				
13.00	8								10.1763	10.1763				
22.00	8								10.2200	10.2200				
23.00	8									10.9650	10.9650			
43.00	8									10.9775	10.9775			
12.00	8										11.0525			
11.00	8											11.3200		
21.00	8												12.0950	
31.00	8													12.3750

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = .266.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

b. Alfa = .05.

## Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: b

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
	a				
Días	28.377	3	9.459	19.424	.000
Concentracion	327.911	24	13.663	28.056	.000
Días * Concentracion	328.689	72	4.565	9.374	.000
Error	48.699	100	.487		
Total	35811.204	200			
Total corregida	733.676	199			

a. R cuadrado = .934 (R cuadrado corregida = .868)

b

Tukey B<sup>b</sup>

Concentracion	N	Subconjunto												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
45.00	8	11.0450												
24.00	8	11.1975	11.1975											
14.00	8	11.2950	11.2950	11.2950										
55.00	8	11.8200	11.8200	11.8200	11.8200									
15.00	8	12.0150	12.0150	12.0150	12.0150									
25.00	8	12.1850	12.1850	12.1850	12.1850	12.1850								
34.00	8		12.3125	12.3125	12.3125	12.3125								
35.00	8			12.3825	12.3825	12.3825	12.3825							
54.00	8			12.4300	12.4300	12.4300	12.4300							
42.00	8				12.5725	12.5725	12.5725	12.5725						
51.00	8				12.9550	12.9550	12.9550	12.9550						
22.00	8				12.9875	12.9875	12.9875	12.9875						
52.00	8					13.2925	13.2925	13.2925	13.2925					
44.00	8						13.5425	13.5425	13.5425	13.5425				
41.00	8						13.5550	13.5550	13.5550	13.5550	13.5550			
33.00	8						13.5625	13.5625	13.5625	13.5625	13.5625	13.5625		
32.00	8							13.7225	13.7225	13.7225	13.7225	13.7225		
11.00	8								14.3400	14.3400	14.3400	14.3400	14.3400	
53.00	8								14.4675	14.4675	14.4675	14.4675	14.4675	
43.00	8								14.4700	14.4700	14.4700	14.4700	14.4700	
13.00	8									14.5550	14.5550	14.5550	14.5550	
23.00	8									14.5875	14.5875	14.5875	14.5875	
31.00	8										14.9875	14.9875	14.9875	
12.00	8											15.2750	15.2750	
21.00	8												15.5300	

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = .487.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

b. Alfa = .05.

## Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: L

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
	<sup>a</sup>				
Días	280.284	3	93.428	63.394	.000
Concentracion	2858.409	24	119.100	80.814	.000
Días * Concentracion	1847.765	72	25.663	17.414	.000
Error	147.376	100	1.474		
Total	283409.739	200			
Total corregida	5133.835	199			

a. R cuadrado = .971 (R cuadrado corregida = .943)

L

Tukey B<sup>b</sup>

Concentracion	N	Subconjunto									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
55.00	8	31.4000									
51.00	8	32.3925									
41.00	8	32.4475									
21.00	8	32.8825									
35.00	8	33.0825									
31.00	8	33.1850									
14.00	8		35.1850								
34.00	8		35.2000								
54.00	8		35.5725	35.5725							
24.00	8		35.7450	35.7450							
11.00	8		35.8050	35.8050							
45.00	8		36.0550	36.0550							
15.00	8		36.3275	36.3275							
44.00	8		36.6600	36.6600	36.6600						
42.00	8			37.3975	37.3975	37.3975					
52.00	8				38.3050	38.3050					
25.00	8				38.4275	38.4275					
22.00	8					39.2250					
53.00	8						39.2250				
43.00	8						40.7750	40.7750			
33.00	8							41.4325	41.4325		
32.00	8							41.8850	41.8850	41.8850	
12.00	8							42.2700	42.2700	42.2700	42.2700
23.00	8								43.2575	43.2575	43.2575
13.00	8									43.5425	43.5425
											44.0725

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 1.474.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

b. Alfa = .05.

## Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: cromaticidad

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
	<sup>a</sup>				
combinacion	479.092	24	19.962	28.330	.000
dias	231.524	3	77.175	109.527	.000
combinacion * dias	460.167	72	6.391	9.070	.000
Error	70.462	100	.705		
Total	56179.414	200			
Total corregida	1241.245	199			

a. R cuadrado = .943 (R cuadrado corregida = .887)

## cromaticidad

Tukey B<sup>a,b</sup>

combinacion	N	Subconjunto								
		1	2	3	4	5	6	7	8	
45.00	8	14.0425								
24.00	8	14.2875	14.2875							
14.00	8	14.9400	14.9400	14.9400						
15.00	8	15.0013	15.0013	15.0013						
51.00	8	15.0025	15.0025	15.0025						
55.00	8	15.3788	15.3788	15.3788	15.3788					
25.00	8		15.5963	15.5963	15.5963					
35.00	8			15.7113	15.7113					
41.00	8			15.8238	15.8238					
42.00	8			15.8550	15.8550					
54.00	8			15.9025	15.9025					
44.00	8			15.9175	15.9175					
34.00	8			16.0313	16.0313					
33.00	8			16.2700	16.2700					
22.00	8				16.6575	16.6575				
32.00	8				16.7200	16.7200				
52.00	8				16.7688	16.7688				
53.00	8					17.6963	17.6963			
13.00	8					17.8600	17.8600			
43.00	8							18.2175		
23.00	8							18.2925	18.2925	
11.00	8							18.3175	18.3175	
12.00	8							18.8950	18.8950	18.8950
31.00	8							19.4650	19.4650	19.4650
21.00	8									19.6950

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = .705.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

## Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: tonalidad

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
combinacion	2182.127	24	90.922	156.227	.000
dias	2208.254	3	736.085	1264.782	.000
combinacion * dias	5227.867	72	72.609	124.761	.000
Error	58.199	100	.582		
Total	592255.613	200			
Total corregida	9676.447	199			

a. R cuadrado = .994 (R cuadrado corregida = .988)

## tonalidad

Tukey B<sup>a,b</sup>

combinacion	N	Subconjunto								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
14.00	8	50.2313								
31.00	8	50.6238	50.6238							
55.00	8	50.6775	50.6775							
34.00	8	51.0600	51.0600	51.0600						
25.00	8		51.5850	51.5850						
11.00	8		51.6325	51.6325						
22.00	8		51.8738	51.8738	51.8738					
24.00	8			52.0125	52.0125					
35.00	8			52.0363	52.0363					
54.00	8			52.1713	52.1713					
21.00	8			52.2263	52.2263					
43.00	8				53.0463	53.0463				
52.00	8				53.0763	53.0763				
45.00	8				53.1125	53.1125				
23.00	8					53.5675				
42.00	8					53.6738				
15.00	8					53.7813				
12.00	8					54.1438				
13.00	8						55.3838			
53.00	8						55.8588	55.8588		
32.00	8						56.2138	56.2138		
33.00	8							56.6750		
44.00	8								59.5325	
51.00	8									62.1375
41.00	8									62.9488

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = .582.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

b. Alfa = .05.

## Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: pH

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Días	48.173	3	16.058	1364.639	.000
Concentracion	16.391	24	.683	58.041	.000
Días * Concentracion	9.770	72	.136	11.532	.000
Error	1.177	100	.012		
Total	8321.873	200			
Total corregida	75.512	199			

a. R cuadrado = .984 (R cuadrado corregida = .969)

## pH

Tukey B<sup>b</sup>

Concentracion	N	Subconjunto									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
22.00	8	6.0625									
23.00	8	6.1238	6.1238								
52.00	8	6.1500	6.1500	6.1500							
42.00	8	6.1538	6.1538	6.1538							
12.00	8	6.1625	6.1625	6.1625							
33.00	8	6.1688	6.1688	6.1688							
43.00	8	6.1800	6.1800	6.1800	6.1800						
53.00	8	6.1900	6.1900	6.1900	6.1900						
11.00	8	6.2250	6.2250	6.2250	6.2250						
32.00	8	6.2500	6.2500	6.2500	6.2500						
13.00	8		6.2650	6.2650	6.2650						
24.00	8			6.3200	6.3200	6.3200					
54.00	8				6.3563	6.3563	6.3563				
34.00	8					6.4425	6.4425	6.4425			
15.00	8					6.4663	6.4663	6.4663			
41.00	8					6.4800	6.4800	6.4800			
55.00	8					6.4900	6.4900	6.4900	6.4900		
25.00	8						6.5138	6.5138	6.5138	6.5138	
44.00	8							6.6038	6.6038	6.6038	
45.00	8							6.6150	6.6150	6.6150	
35.00	8								6.6625	6.6625	
14.00	8								6.6700	6.6700	
51.00	8									6.6800	
21.00	8										7.1450
31.00	8										7.1538

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = .012.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

b. Alfa = .05.

## Nitrito de sodio

## Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Mesof ilos

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
	a				
Días	88.783	3	29.594	1432.790	.000
Concentracion	16.630	24	.693	33.547	.000
Días * Concentracion	54.878	72	.762	36.901	.000
Error	2.066	100	.021		
Total	7483.582	200			
Total corregida	162.356	199			

a. R cuadrado = .987 (R cuadrado corregida = .975)

## Mesofilos

Tukey B<sup>a,b</sup>

Concentracion	N	Subconjunto						
		1	2	3	4	5	6	7
35.00	8	5.0325						
24.00	8		5.7188					
15.00	8		5.7263					
11.00	8		5.7288					
14.00	8		5.7500					
13.00	8		5.8188	5.8188				
25.00	8		5.9100	5.9100	5.9100			
12.00	8			6.0125	6.0125	6.0125		
34.00	8				6.0650	6.0650	6.0650	
22.00	8				6.0725	6.0725	6.0725	6.0725
32.00	8				6.0900	6.0900	6.0900	6.0900
54.00	8				6.1150	6.1150	6.1150	6.1150
33.00	8				6.1338	6.1338	6.1338	6.1338
21.00	8				6.1563	6.1563	6.1563	6.1563
53.00	8					6.1750	6.1750	6.1750
44.00	8					6.2175	6.2175	6.2175
23.00	8					6.2275	6.2275	6.2275
55.00	8					6.2488	6.2488	6.2488
43.00	8					6.2663	6.2663	6.2663
52.00	8					6.2663	6.2663	6.2663
31.00	8					6.2688	6.2688	6.2688
42.00	8						6.2975	6.2975
51.00	8						6.3075	6.3075
45.00	8						6.3188	6.3188
41.00	8							6.3338

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = .021.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

b. Alf a = .05.

## Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: E.coli

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
	a				
Dias	228.653	3	76.218	5498.322	.000
Concentracion	20.651	24	.860	62.074	.000
Dias * Concentracion	25.356	72	.352	25.406	.000
Error	1.386	100	.014		
Total	5644.599	200			
Total corregida	276.047	199			

a. R cuadrado = .995 (R cuadrado corregida = .990)

## E.coli

Tukey B<sup>a,b</sup>

Concentracion	N	Subconjunto												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
25.00	8	4.6800												
31.00	8	4.6813												
34.00	8	4.6925												
35.00	8	4.7463												
23.00	8	4.7550												
24.00	8	4.7600												
32.00	8	4.8563												
33.00	8		5.0500											
44.00	8		5.1025	5.1025										
52.00	8		5.1275	5.1275	5.1275									
45.00	8		5.1400	5.1400	5.1400	5.1400								
51.00	8		5.2013	5.2013	5.2013	5.2013	5.2013							
41.00	8		5.2288	5.2288	5.2288	5.2288	5.2288							
53.00	8			5.2600	5.2600	5.2600	5.2600	5.2600						
42.00	8				5.3163	5.3163	5.3163	5.3163	5.3163					
22.00	8					5.3363	5.3363	5.3363	5.3363	5.3363				
21.00	8						5.3488	5.3488	5.3488	5.3488				
43.00	8							5.3713	5.3713	5.3713	5.3713			
15.00	8								5.4363	5.4363	5.4363	5.4363		5.4363
54.00	8									5.4613	5.4613	5.4613	5.4613	5.4613
55.00	8										5.4963	5.4963	5.4963	5.4963
13.00	8											5.5350	5.5350	5.5350
14.00	8												5.5625	5.5625
11.00	8													5.6088
12.00	8													5.7713

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = .014.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

b. Alfa = .05.

## Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Coliformes

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
	a				
Dias	177.608	3	59.203	2977.483	.000
Concentracion	26.449	24	1.102	55.426	.000
Dias * Concentracion	42.677	72	.593	29.810	.000
Error	1.988	100	.020		
Total	6005.476	200			
Total corregida	248.723	199			

a. R cuadrado = .992 (R cuadrado corregida = .984)

Coliformes

Tukey B<sup>a,b</sup>

Concentracion	N	Subconjunto														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
32.00	8	4.9150														
15.00	8	4.9250														
35.00	8	4.9313	4.9313													
34.00	8	4.9600	4.9600													
33.00	8	5.0763	5.0763	5.0763												
24.00	8	5.0838	5.0838	5.0838												
23.00	8	5.1325	5.1325	5.1325	5.1325											
13.00	8		5.1638	5.1638	5.1638	5.1638										
44.00	8			5.2013	5.2013	5.2013	5.2013									
25.00	8			5.2113	5.2113	5.2113	5.2113	5.2113								
11.00	8			5.2588	5.2588	5.2588	5.2588	5.2588								
21.00	8			5.2750	5.2750	5.2750	5.2750	5.2750	5.2750							
14.00	8			5.2763	5.2763	5.2763	5.2763	5.2763	5.2763							
31.00	8				5.3575	5.3575	5.3575	5.3575	5.3575	5.3575						
52.00	8					5.3863	5.3863	5.3863	5.3863	5.3863	5.3863					
45.00	8						5.4263	5.4263	5.4263	5.4263	5.4263	5.4263				
53.00	8							5.5088	5.5088	5.5088	5.5088	5.5088	5.5088			
42.00	8								5.5100	5.5100	5.5100	5.5100	5.5100			
43.00	8									5.5263	5.5263	5.5263	5.5263			
12.00	8										5.5800	5.5800	5.5800			
22.00	8											5.6188	5.6188			
54.00	8												5.6213	5.6213		
55.00	8													5.6700	5.6700	
51.00	8														5.8713	
41.00	8															6.6400

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.  
 Basado en la suma de cuadrados tipo III  
 El término error es la Media cuadrática (Error) = .020.

- a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000
- b. Alfa = .05.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: a

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Días	89.361	3	29.787	727.578	.000
Concentracion	984.904	24	41.038	1002.385	.000
Días * Concentracion	968.831	72	13.456	328.676	.000
Error	4.094	100	.041		
Total	27537.300	200			
Total corregida	2047.190	199			

a. R cuadrado = .998 (R cuadrado corregida = .996)

a

Tukey B<sup>a,b</sup>

Concentracion	N	Subconjunto																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
51.00	8	7.2125																
41.00	8		7.6775															
53.00	8			8.7625														
12.00	8			8.7675														
11.00	8			8.9925														
55.00	8				9.6300													
54.00	8				9.6550													
52.00	8					9.9725												
45.00	8						10.5100											
22.00	8						10.6800											
43.00	8							10.7825										
23.00	8								11.0675									
25.00	8									11.4325								
24.00	8									11.5025								
42.00	8										11.6500							
32.00	8											11.7100						
33.00	8												12.0475					
21.00	8												12.0950	12.0950				
31.00	8													12.3750				
13.00	8													12.5375				
35.00	8														13.1500			
44.00	8															13.4875		
14.00	8																14.8825	
34.00	8																	15.4700
15.00	8																	16.1850

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.  
 Basado en la suma de cuadrados tipo III  
 El término error es la Media cuadrática (Error) = .041.

- a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000
- b. Alfa = .05.

## Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: b

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
	a				
Dias	44.970	3	14.990	1213.973	.000
Concentracion	88.446	24	3.685	298.449	.000
Dias * Concentracion	197.888	72	2.748	222.582	.000
Error	1.235	100	.012		
Total	42759.219	200			
Total corregida	332.539	199			

a. R cuadrado = .996 (R cuadrado corregida = .993)

b

Tukey B <sup>b</sup>		Subconjunto														
Concentracion	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
51.00	8	12.9650														
12.00	8		13.4900													
41.00	8		13.5550													
11.00	8			13.8450												
54.00	8				14.0700											
13.00	8				14.1125	14.1125										
32.00	8				14.2150	14.2150	14.2150									
52.00	8					14.2825	14.2825									
33.00	8						14.3475	14.3475								
53.00	8						14.3775	14.3775								
55.00	8							14.3875	14.3875							
42.00	8								14.5025	14.5025						
45.00	8								14.5175	14.5175						
44.00	8									14.5950						
35.00	8										14.7925					
25.00	8										14.8425					
31.00	8											14.9875	14.9875			
14.00	8												15.0025	15.0025		
43.00	8												15.0100	15.0100		
22.00	8													15.1175	15.1175	
15.00	8													15.1450	15.1450	
23.00	8														15.2650	15.2650
24.00	8														15.3175	15.3175
21.00	8															15.5300
34.00	8															15.8575

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III.

El término error es la Media cuadrática (Error) = .012.

a. 11 es el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

## Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: L

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
	a				
Dias	131.769	3	43.923	245.161	.000
Concentracion	323.418	24	13.476	75.216	.000
Dias * Concentracion	400.226	72	5.559	31.026	.000
Error	17.916	100	.179		
Total	232501.248	200			
Total corregida	873.330	199			

a. R cuadrado = .979 (R cuadrado corregida = .959)

L

Tukey B<sup>a,b</sup>

Concentracion	N	Subconjunto													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			
55.00	8	31.7325													
12.00	8	32.0000	32.0000												
51.00	8		32.3925	32.3925											
41.00	8		32.4475	32.4475											
42.00	8			32.7875	32.7875										
21.00	8			32.8825	32.8825										
13.00	8			33.0525	33.0525	33.0525									
31.00	8				33.1850	33.1850									
43.00	8				33.3425	33.3425									
15.00	8					33.5975	33.5975								
35.00	8					33.6625	33.6625								
34.00	8							34.1500							
24.00	8							34.2050							
54.00	8								34.3900						
44.00	8									34.4825					
53.00	8										34.5175				
52.00	8											34.5175			
33.00	8												34.5575		
25.00	8													34.6300	
11.00	8														34.6925
45.00	8														34.8000
32.00	8														34.8000
23.00	8														35.1813
14.00	8														35.1813
22.00	8														35.4200
															35.4200
															35.6475
															36.4600
															36.5700

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = .179.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

b. Alfa = .05.

**Pruebas de los efectos i inter-sujetos**

Variable dependiente: cromaticidad

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
combinacion	616.378	24	25.682	631.196	.000
dias	27.473	3	9.158	225.068	.000
combinacion * dias	755.805	72	10.497	257.992	.000
Error	4.069	100	.041		
Total	70296.588	200			
Total corregida	1403.724	199			

a. R cuadrado = .997 (R cuadrado corregida = .994)

cromaticidad

Tukey B<sup>a,b</sup>

combinacion	N	Subconjunto																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
51.00	8	15.0025																
41.00	8		15.8238															
12.00	8			16.3500														
11.00	8				16.8313													
53.00	8				16.8613													
54.00	8				17.0638													
55.00	8					17.3200												
52.00	8					17.3200												
45.00	8						17.4500											
32.00	8							17.9650										
43.00	8								18.4275									
22.00	8								18.5050	18.5050								
42.00	8								18.5138	18.5138								
25.00	8								18.6225	18.6225	18.6225							
33.00	8									18.7763	18.7763	18.7763						
23.00	8									18.8038	18.8038	18.8038						
13.00	8										18.8625	18.8625	18.8625					
24.00	8										19.0025	19.0025	19.1700					
31.00	8													19.4650				
21.00	8													19.6950				
35.00	8														19.8163			
44.00	8														19.9213			
14.00	8															21.2425		
34.00	8																22.1950	
15.00	8																	22.3075

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = .041.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

b. Alfa = .05.

## Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: tonalidad

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
	a				
combinacion	4708.364	24	196.182	1431.754	.000
dias	1295.159	3	431.720	3150.732	.000
combinacion * dias	5020.485	72	69.729	508.889	.000
Error	13.702	100	.137		
Total	575531.211	200			
Total corregida	11037.711	199			

a. R cuadrado = .999 (R cuadrado corregida = .998)

tonalidad

Tukey B <sup>a,b</sup>		Subconjunto																	
combinacion	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
15.00	8	44.1913																	
14.00	8		45.9700																
34.00	8		46.0288																
44.00	8			47.2450															
35.00	8				48.5150														
13.00	8					49.2088													
33.00	8						50.1650												
32.00	8						50.5425												
31.00	8						50.6225												
42.00	8							51.2738											
21.00	8								52.2263										
25.00	8								52.4488										
24.00	8									53.0875									
23.00	8										54.0075								
45.00	8										54.1075								
43.00	8										54.4538								
22.00	8											54.4538							
52.00	8											54.7450							
54.00	8												55.3650						
55.00	8												55.5350						
12.00	8													56.3225					
53.00	8														58.5875				
11.00	8														58.6688				
51.00	8															59.7675			
41.00	8																62.1388		
																		62.9488	

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = .137.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

b. Alfa = .05.

## Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: pH

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
	a				
Dias	115.420	3	38.473	9820.892	.000
Concentracion	11.963	24	.498	127.241	.000
Dias * Concentracion	5.196	72	.072	18.423	.000
Error	.392	100	.004		
Total	9510.212	200			
Total corregida	132.971	199			

a. R cuadrado = .997 (R cuadrado corregida = .994)

## pH

Tukey B<sup>b</sup>

Concentracion	N	Subconjunto										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
15.00	8	6.2875										
11.00	8		6.4525									
41.00	8		6.4800									
54.00	8		6.5338									
55.00	8		6.5513									
14.00	8			6.6550								
51.00	8			6.6800	6.6800							
53.00	8			6.6938	6.6938	6.6938						
13.00	8				6.7613	6.7613	6.7613					
24.00	8					6.7825	6.7825					
12.00	8						6.8288					
43.00	8						6.8300					
42.00	8							6.9400				
44.00	8							6.9425				
35.00	8							6.9575				
45.00	8							6.9850	6.9850			
25.00	8							7.0138	7.0138			
22.00	8							7.0300	7.0300	7.0300		
52.00	8								7.0675	7.0675	7.0675	7.0675
34.00	8								7.0788	7.0788	7.0788	7.0788
23.00	8								7.0850	7.0850	7.0850	7.0850
32.00	8									7.1225	7.1225	7.1225
33.00	8									7.1263	7.1263	7.1263
21.00	8										7.1450	7.1450
31.00	8											7.1538

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = .004.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

b. Alfa = .05.

## Base de datos Microbiológico (cinco mejores combinaciones)

dias	Combinacion	Mesofilos	Combinación	E.coli	Combinacion	Coliformes
0	123	5.72	134	4.16	114	3.58
0	123	5.73	134	4.12	114	3.60
3	123	6.15	134	4.10	114	4.90
3	123	6.06	134	4.21	114	4.97
6	123	6.06	134	5.81	114	6.28
6	123	5.92	134	5.64	114	6.47
9	123	6.12	134	5.92	114	6.76
9	123	6.15	134	5.85	114	7.23
0	132	5.53	142	4.24	115	3.26
0	132	5.72	142	4.15	115	3.36
3	132	6.45	142	4.33	115	4.87
3	132	6.40	142	4.34	115	4.68
6	132	5.76	142	5.81	115	5.58
6	132	5.72	142	5.98	115	6.53
9	132	6.32	142	5.91	115	5.48
9	132	6.43	142	5.81	115	5.60
0	135	5.99	143	3.89	121	5.01
0	135	5.85	143	4.18	121	4.82
3	135	6.00	143	3.87	121	3.90
3	135	6.06	143	4.23	121	4.20
6	135	5.31	143	5.64	121	6.09
6	135	5.44	143	5.62	121	6.13
9	135	6.25	143	5.94	121	5.97
9	135	6.31	143	6.09	121	6.08
0	154	4.13	152	4.45	131	4.90
0	154	4.04	152	4.51	131	4.98
3	154	6.64	152	4.05	131	3.86
3	154	6.72	152	3.88	131	3.75
6	154	5.82	152	6.01	131	6.01
6	154	5.70	152	5.88	131	6.02
9	154	6.82	152	6.31	131	6.76
9	154	7.05	152	6.32	131	6.58
0	155	3.87	155	4.26	135	5.00
0	155	4.06	155	4.26	135	5.18
3	155	5.72	155	3.38	135	6.13
3	155	5.93	155	3.86	135	6.31
6	155	6.72	155	5.95	135	5.31
6	155	5.30	155	5.30	135	5.44
9	155	6.11	155	5.78	135	6.40
9	155	6.24	155	5.85	135	6.21

dias	Combinación	Mesofilos	Combinación	<i>E.coli</i>	Combinación	Coliformes
0	235	2.78	235	3.45	235	3.30
0	235	3.26	235	3.53	235	3.68
3	235	4.08	235	3.64	235	3.30
3	235	4.16	235	3.70	235	3.34
6	235	4.26	235	3.26	235	3.26
6	235	4.12	235	3.41	235	3.41
9	235	5.27	235	4.11	235	4.24
9	235	5.43	235	3.92	235	4.07
0	243	3.34	243	3.48	243	3.38
0	243	3.62	243	3.62	243	3.34
3	243	4.56	243	3.56	243	3.45
3	243	4.66	243	3.34	243	3.30
6	243	5.16	243	3.70	243	3.34
6	243	5.22	243	3.73	243	3.45
9	243	6.09	243	4.31	243	3.90
9	243	6.38	243	4.27	243	3.78
0	252	4.06	252	3.48	252	3.48
0	252	4.03	252	3.75	252	3.08
3	252	4.31	252	3.73	252	3.73
3	252	4.13	252	3.51	252	3.76
6	252	5.39	252	3.85	252	4.06
6	252	5.41	252	3.68	252	4.04
9	252	6.37	252	3.86	252	5.32
9	252	6.26	252	3.95	252	5.35
0	253	3.53	253	3.60	253	3.38
0	253	3.58	253	3.45	253	3.30
3	253	4.95	253	3.45	253	3.51
3	253	4.78	253	3.56	253	3.34
6	253	4.86	253	3.91	253	3.58
6	253	4.73	253	3.51	253	3.08
9	253	6.28	253	4.20	253	3.90
9	253	6.17	253	4.15	253	3.76
0	255	3.34	255	3.34	255	3.15
0	255	3.08	255	3.08	255	3.00
3	255	4.39	255	3.00	255	3.20
3	255	4.38	255	2.90	255	3.00
6	255	4.11	255	3.41	255	3.51

días	Combinación	Mesofilos	Combinación	<i>E.coli</i>	Combinación	Coliformes
0	322	5.38	323	3.48	323	4.39
0	322	5.25	323	3.26	323	4.34
3	322	6.06	323	3.78	323	3.72
3	322	5.05	323	3.72	323	3.93
6	322	6.42	323	6.06	323	6.08
6	322	6.47	323	5.92	323	6.15
9	322	7.01	323	5.92	323	6.19
9	322	6.94	323	5.90	323	6.26
0	324	4.30	324	3.48	324	4.31
0	324	4.20	324	3.26	324	4.11
3	324	5.70	324	3.53	324	3.89
3	324	5.76	324	3.66	324	3.85
6	324	6.45	324	5.99	324	5.75
6	324	6.42	324	5.88	324	5.88
9	324	6.49	324	6.16	324	6.68
9	324	6.43	324	6.12	324	6.20
0	325	4.23	332	3.60	332	3.97
0	325	4.20	332	3.89	332	4.01
3	325	6.09	332	3.82	332	3.90
3	325	6.10	332	4.00	332	3.76
6	325	6.40	332	5.76	332	5.85
6	325	6.39	332	5.72	332	5.82
9	325	6.99	332	6.01	332	6.05
9	325	6.88	332	6.05	332	5.96
0	334	5.30	334	3.20	334	4.06
0	334	5.00	334	3.51	334	3.78
3	334	5.92	334	3.60	334	4.13
3	334	6.10	334	3.64	334	4.21
6	334	6.17	334	5.81	334	5.81
6	334	6.34	334	5.64	334	5.93
9	334	6.87	334	6.09	334	5.93
9	334	6.82	334	6.05	334	5.83
0	335	5.70	335	3.92	335	3.76
0	335	5.41	335	3.86	335	3.89
3	335	6.13	335	3.75	335	4.21
3	335	6.09	335	3.72	335	4.04
6	335	6.48	335	5.31	335	5.91
6	335	6.35	335	5.44	335	5.75
9	335	7.03	335	5.96	335	5.98
9	335	6.82	335	6.01	335	5.91

### Base de datos Color y pH (cinco mejores combinaciones)

días	Combinación	pH	Combianación	L	Combinación a	Combinación b	Combinación	Cromaticidad	Combinación	Tonalidad		
0	114	5.86	132	32.80	115	12.20	123	16.81	114	17.66	132	48.44
0	114	5.86	132	32.30	115	12.14	123	16.59	114	17.50	132	48.56
3	114	6.06	132	31.69	115	11.93	123	13.16	114	20.36	132	46.61
3	114	6.03	132	31.15	115	11.87	123	13.06	114	20.04	132	47.15
6	114	6.62	132	30.91	115	11.79	123	9.02	114	17.97	132	67.88
6	114	6.53	132	30.25	115	11.21	123	8.92	114	17.80	132	68.55
9	114	7.41	132	30.67	115	8.66	123	9.32	114	18.30	132	82.06
9	114	7.10	132	29.29	115	8.50	123	9.14	114	18.06	132	82.94
0	115	5.90	145	32.04	121	12.55	124	17.10	121	20.09	152	60.55
0	115	5.93	145	31.92	121	12.37	124	16.96	121	19.92	152	60.84
3	115	5.95	145	33.14	121	10.00	124	13.06	121	17.52	152	51.57
3	115	5.92	145	32.28	121	9.74	124	13.00	121	17.33	152	52.42
6	115	5.95	145	28.27	121	13.67	124	11.05	121	21.60	152	60.03
6	115	5.93	145	28.17	121	13.51	124	10.83	121	21.09	152	60.31
9	115	6.02	145	26.15	121	12.54	124	9.79	121	20.10	152	64.26
9	115	6.03	145	25.75	121	12.38	124	9.69	121	19.91	152	66.48
0	141	5.64	152	32.43	131	13.92	132	15.86	131	21.00	153	58.32
0	141	5.67	152	32.31	131	13.32	132	15.70	131	20.51	153	59.12
3	141	5.79	152	31.40	131	12.55	132	12.65	131	18.89	153	46.43
3	141	5.78	152	30.28	131	12.37	132	12.55	131	18.64	153	46.58
6	141	6.74	152	33.11	131	9.97	132	10.97	131	17.76	153	51.04
6	141	6.80	152	32.49	131	9.63	132	10.79	131	17.41	153	52.34
9	141	7.72	152	27.60	131	13.73	132	9.10	131	20.89	153	63.02
9	141	7.70	152	26.68	131	13.51	132	8.96	131	20.62	153	63.05
0	144	5.76	153	33.84	153	9.61	134	15.82	153	18.30	154	63.10
0	144	5.75	153	32.63	153	9.13	134	15.74	153	17.79	154	63.16
3	144	6.09	153	30.51	153	12.30	134	13.43	153	17.85	154	47.75
3	144	6.10	153	30.37	153	12.14	134	13.35	153	17.66	154	48.06
6	144	7.36	153	26.38	153	10.86	134	11.89	153	17.27	154	58.55
6	144	7.06	153	26.10	153	10.24	134	11.79	153	16.76	154	58.63
9	144	7.54	153	33.84	153	6.45	134	8.90	153	14.22	154	72.52
9	144	7.53	153	33.12	153	6.37	134	8.80	153	14.06	154	73.46
0	145	5.73	155	33.88	155	8.46	145	15.77	155	18.13	155	62.19
0	145	5.73	155	33.56	155	8.30	145	15.61	155	17.79	155	62.20
3	145	5.66	155	34.56	155	9.17	145	13.35	155	15.01	155	52.34
3	145	5.74	155	33.98	155	8.61	145	13.15	155	14.48	155	53.51
6	145	7.37	155	27.52	155	12.28	145	10.49	155	18.04	155	47.09
6	145	7.15	155	27.30	155	12.08	145	10.45	155	17.87	155	47.47
9	145	7.70	155	27.39	155	10.52	145	8.93	155	16.25	155	49.64
9	145	7.85	155	27.05	155	10.02	145	8.87	155	15.85	155	50.79

días	Combinación	pH	Combinación	L	Combinación	a	Combinación	b	Combinación	Cromaticidad	Combinación	Tonalidad
0	232	5.86	221	33.72	222	13.20	224	10.91	223	23.47	235	46.84
0	232	5.87	221	33.20	222	12.30	224	10.39	223	21.52	235	45.34
3	232	5.69	221	35.46	222	9.85	224	12.70	223	18.07	235	56.85
3	232	5.75	221	34.70	222	8.77	224	11.60	223	17.17	235	56.62
6	232	6.17	221	28.83	222	10.95	224	12.33	223	17.40	235	53.61
6	232	6.11	221	43.83	222	10.87	224	10.93	223	16.53	235	54.41
9	232	7.24	221	33.87	222	8.19	224	11.14	223	16.55	235	51.77
9	232	7.31	221	33.05	222	7.63	224	10.48	223	15.63	235	50.85
0	243	5.81	235	22.23	223	15.98	225	14.13	232	19.11	243	50.94
0	243	5.89	235	20.89	223	14.58	225	13.89	232	17.11	243	48.80
3	243	5.77	235	41.52	223	10.20	225	13.70	232	18.33	243	55.78
3	243	5.79	235	39.54	223	9.86	225	13.22	232	17.32	243	55.42
6	243	6.03	235	34.70	223	9.93	225	9.36	232	18.52	243	48.70
6	243	6.38	235	32.78	223	9.49	225	8.80	232	16.52	243	46.81
9	243	6.88	235	37.40	223	9.16	225	12.73	232	14.26	243	58.42
9	243	6.89	235	35.60	223	8.52	225	11.65	232	12.59	243	59.50
0	252	5.93	241	34.60	234	12.66	234	15.86	243	21.88	252	45.99
0	252	5.95	241	34.18	234	10.86	234	15.24	243	20.27	252	44.00
3	252	5.79	241	33.93	234	7.72	234	11.45	243	17.58	252	51.00
3	252	5.79	241	33.53	234	7.32	234	10.85	243	16.93	252	49.75
6	252	6.41	241	32.88	234	14.17	234	12.96	243	18.61	252	52.57
6	252	6.54	241	31.92	234	13.47	234	12.16	243	17.04	252	53.20
9	252	6.17	241	29.73	234	7.66	234	10.36	243	16.88	252	63.85
9	252	6.62	241	28.81	234	7.38	234	9.62	243	16.55	252	64.25
0	253	5.62	251	33.90	243	13.79	235	12.04	252	19.66	253	45.04
0	253	5.91	251	33.66	243	13.35	235	10.90	252	17.88	253	44.67
3	253	5.67	251	32.79	243	9.89	235	14.21	252	14.28	253	56.84
3	253	5.73	251	31.81	243	9.61	235	12.75	252	13.42	253	57.20
6	253	6.54	251	32.37	243	12.28	235	15.14	252	17.88	253	60.03
6	253	6.44	251	32.23	243	11.66	235	14.98	252	16.71	253	60.08
9	253	6.72	251	31.38	243	8.84	235	9.89	252	17.29	253	61.52
9	253	6.89	251	31.00	243	8.40	235	9.15	252	17.03	253	61.49
0	255	6.02	255	24.85	252	13.66	255	9.89	253	20.29	255	43.50
0	255	6.05	255	24.21	252	12.86	255	9.15	253	19.52	255	43.34
3	255	6.10	255	35.45	252	8.99	255	12.78	253	17.85	255	53.52
3	255	6.06	255	33.39	252	8.67	255	11.62	253	16.39	255	52.96
6	255	6.52	255	35.51	252	10.87	255	12.11	253	16.58	255	54.34
6	255	6.72	255	33.71	252	10.01	255	11.17	253	15.60	255	57.09
9	255	7.18	255	32.77	252	7.62	255	13.03	253	17.95	255	50.61
9	255	7.27	255	31.31	252	7.40	255	11.61	253	17.39	255	50.06

Días	Combinación	pH	Combinación	L	Combinación	a	Combinación	b	Combinación	Cromaaticidad	Combinación	Tonalidad
0	232	5.86	221	33.72	222	13.20	224	10.91	223	23.47	235	46.84
0	232	5.87	221	33.20	222	12.30	224	10.39	223	21.52	235	45.34
3	232	5.69	221	35.46	222	9.85	224	12.70	223	18.07	235	56.85
3	232	5.75	221	34.70	222	8.77	224	11.60	223	17.17	235	56.62
6	232	6.17	221	28.83	222	10.95	224	12.33	223	17.40	235	53.61
6	232	6.11	221	43.83	222	10.87	224	10.93	223	16.53	235	54.41
9	232	7.24	221	33.87	222	8.19	224	11.14	223	16.55	235	51.77
9	232	7.31	221	33.05	222	7.63	224	10.48	223	15.63	235	50.85
0	243	5.81	235	22.23	223	15.98	225	14.13	232	19.11	243	50.94
0	243	5.89	235	20.89	223	14.58	225	13.89	232	17.11	243	48.80
3	243	5.77	235	41.52	223	10.20	225	13.70	232	18.33	243	55.78
3	243	5.79	235	39.54	223	9.86	225	13.22	232	17.32	243	55.42
6	243	6.03	235	34.70	223	9.93	225	9.36	232	18.52	243	48.70
6	243	6.38	235	32.78	223	9.49	225	8.80	232	16.52	243	46.81
9	243	6.88	235	37.40	223	9.16	225	12.73	232	14.26	243	58.42
9	243	6.89	235	35.60	223	8.52	225	11.65	232	12.59	243	59.50
0	252	5.93	241	34.60	234	12.66	234	15.86	243	21.88	252	45.99
0	252	5.95	241	34.18	234	10.86	234	15.24	243	20.27	252	44.00
3	252	5.79	241	33.93	234	7.72	234	11.45	243	17.58	252	51.00
3	252	5.79	241	33.53	234	7.32	234	10.85	243	16.93	252	49.75
6	252	6.41	241	32.88	234	14.17	234	12.96	243	18.61	252	52.57
6	252	6.54	241	31.92	234	13.47	234	12.16	243	17.04	252	53.20
9	252	6.17	241	29.73	234	7.66	234	10.36	243	16.88	252	63.85
9	252	6.62	241	28.81	234	7.38	234	9.62	243	16.55	252	64.25
0	253	5.62	251	33.90	243	13.79	235	12.04	252	19.66	253	45.04
0	253	5.91	251	33.66	243	13.35	235	10.90	252	17.88	253	44.67
3	253	5.67	251	32.79	243	9.89	235	14.21	252	14.28	253	56.84
3	253	5.73	251	31.81	243	9.61	235	12.75	252	13.42	253	57.20
6	253	6.54	251	32.37	243	12.28	235	15.14	252	17.88	253	60.03
6	253	6.44	251	32.23	243	11.66	235	14.98	252	16.71	253	60.08
9	253	6.72	251	31.38	243	8.84	235	9.89	252	17.29	253	61.52
9	253	6.89	251	31.00	243	8.40	235	9.15	252	17.03	253	61.49
0	255	6.02	255	24.85	252	13.66	255	9.89	253	20.29	255	43.50
0	255	6.05	255	24.21	252	12.86	255	9.15	253	19.52	255	43.34
3	255	6.10	255	35.45	252	8.99	255	12.78	253	17.85	255	53.52
3	255	6.06	255	33.39	252	8.67	255	11.62	253	16.39	255	52.96
6	255	6.52	255	35.51	252	10.87	255	12.11	253	16.58	255	54.34
6	255	6.72	255	33.71	252	10.01	255	11.17	253	15.60	255	57.09
9	255	7.18	255	32.77	252	7.62	255	13.03	253	17.95	255	50.61
9	255	7.27	255	31.31	252	7.40	255	11.61	253	17.39	255	50.06

Días	Combinación	pH	Combinación	L	Combinación	a	Combinación	b	Combinación	Cromaaticidad	Combinación	Tonalidad
0	311	5.63	312	35.73	322	10.52	351	15.3	323	19.69	332	52.22
0	311	5.60	312	34.79	322	10.38	351	15.2	323	19.20	332	52.52
3	311	5.82	312	33.97	322	10.96	351	13.21	323	17.94	332	49.57
3	311	5.88	312	33.75	322	10.86	351	13.05	323	17.85	332	49.85
6	311	6.56	312	27.66	322	10.98	351	12.58	323	18.77	332	47.56
6	311	6.54	312	27.18	322	10.84	351	12.52	323	18.57	332	47.89
9	311	7.81	312	32.09	322	10.5	351	10.99	323	19.50	332	52.54
9	311	7.78	312	30.83	322	10.4	351	10.79	323	19.38	332	52.19
0	315	5.64	341	34.6	323	11.49	352	14.74	324	20.41	333	54.01
0	315	5.65	341	34.18	323	10.77	352	14.64	324	20.27	333	54.25
3	315	5.91	341	33.84	323	11.27	352	15.1	324	18.33	333	49.94
3	315	5.88	341	33.62	323	11.17	352	15.02	324	17.97	333	49.79
6	315	6.11	341	32.88	323	10.88	352	12.74	324	17.99	333	42.18
6	315	6.32	341	31.92	323	10.70	352	12.64	324	17.71	333	42.89
9	315	7.28	341	29.73	323	11.15	352	14.74	324	20.42	333	53.89
9	315	7.51	341	28.81	323	11.11	352	14.64	324	20.26	333	54.37
0	341	5.64	342	33.47	324	12.17	353	13.96	334	21.66	334	48.52
0	341	5.67	342	33.19	324	12.05	353	13.82	334	21.58	334	48.53
3	341	5.79	342	31.3	324	12.01	353	15.02	334	19.28	334	46.76
3	341	5.78	342	30.68	324	11.55	353	14.78	334	19.09	334	46.70
6	341	6.74	342	33.69	324	10.17	353	14.88	334	26.49	334	40.28
6	341	6.80	342	33.31	324	9.85	353	14.78	334	26.22	334	40.39
9	341	7.72	342	33.48	324	12.16	353	13.94	334	21.70	334	48.49
9	341	7.70	342	33.18	324	12.06	353	13.84	334	21.54	334	48.56
0	354	5.84	351	33.9	325	11.61	354	14.62	335	19.57	335	50.64
0	354	5.81	351	33.66	325	11.55	354	14.48	335	19.36	335	50.91
3	354	5.90	351	32.77	325	13.28	354	15.02	335	18.13	335	48.35
3	354	5.96	351	31.83	325	13.02	354	14.78	335	17.98	335	48.25
6	354	6.69	351	32.37	325	9.58	354	15.02	335	22.65	335	43.57
6	354	6.64	351	32.23	325	9.26	354	14.78	335	21.91	335	44.85
9	354	7.68	351	31.38	325	11.72	354	14.59	335	19.54	335	50.65
9	354	7.75	351	31	325	11.44	354	14.51	335	19.39	335	50.90
0	355	5.82	355	31.82	332	11.28	355	15.15	344	20.56	344	50.92
0	355	5.81	355	31.34	332	11.14	355	15.07	344	20.24	344	51.06
3	355	5.82	355	31.9	332	11.74	355	14.4	344	18.00	344	45.14
3	355	5.78	355	31.44	332	11.44	355	14.38	344	17.58	344	45.51
6	355	7.05	355	32.19	332	12.95	355	13.02	344	21.22	344	41.58
6	355	6.93	355	32.01	332	12.71	355	12.86	344	20.98	344	41.77
9	355	7.57	355	31.68	332	11.27	355	15.14	344	20.49	344	51.02
9	355	7.63	355	31.48	332	11.15	355	15.08	344	20.30	344	50.96

### Análisis estadístico

Las siguientes tablas muestran los resultados del análisis de varianza ANDEVA y la prueba de comparaciones múltiples de Turkey B, para ver el efecto entre conservadores con las cinco mejores combinaciones.

#### Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: mesofilos

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
	a				
Condicion	53.157	14	3.797	104.532	.000
dias	54.316	3	18.105	498.454	.000
Condicion * dias	18.984	42	.452	12.444	.000
Error	2.179	60	.036		
Total	3754.898	120			
Total corregida	128.637	119			

a. R cuadrado = .983 (R cuadrado corregida = .966)

#### mesofilos

Tukey B<sup>a,b</sup>

Condicion	N	Subconjunto					
		1	2	3	4	5	6
235.00	8	4.1700					
255.00	8	4.2463					
253.00	8		4.8600				
243.00	8		4.8788				
252.00	8		4.9950				
155.00	8			5.4938			
324.00	8			5.7188	5.7188		
154.00	8				5.8650	5.8650	
135.00	8				5.9013	5.9013	
325.00	8				5.9100	5.9100	
123.00	8				5.9888	5.9888	5.9888
132.00	8					6.0413	6.0413
334.00	8					6.0650	6.0650
322.00	8					6.0725	6.0725
335.00	8						6.2513

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = .036.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

b. Alfa = .05.

## Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Ecoli

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
	a				
Condicion	44.002	14	3.143	183.018	.000
dias	64.795	3	21.598	1257.661	.000
Condicion * dias	22.258	42	.530	30.858	.000
Error	1.030	60	.017		
Total	2524.253	120			
Total corregida	132.085	119			

a. R cuadrado = .992 (R cuadrado corregida = .985)

## Ecoli

Tukey B<sup>a,b</sup>

Condicion	N	Subconjunto						
		1	2	3	4	5	6	7
255.00	8	3.3425						
235.00	8		3.6275					
252.00	8		3.7263					
253.00	8		3.7288					
243.00	8		3.7513					
334.00	8			4.6925				
335.00	8			4.7463	4.7463			
323.00	8			4.7550	4.7550			
324.00	8			4.7600	4.7600			
155.00	8			4.8300	4.8300	4.8300		
332.00	8			4.8563	4.8563	4.8563		
143.00	8				4.9325	4.9325	4.9325	
134.00	8					4.9763	4.9763	
142.00	8						5.0713	5.0713
152.00	8							5.1763

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = .017.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

b. Alfa = .05.

## Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Coliformes

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
	a				
Condicion	74.760	14	5.340	219.378	.000
dias	57.868	3	19.289	792.437	.000
Condicion * dias	29.545	42	.703	28.899	.000
Error	1.461	60	.024		
Total	2762.427	120			
Total corregida	163.633	119			

a. R cuadrado = .991 (R cuadrado corregida = .982)

## Coliformes

Tukey B<sup>a,b</sup>

Condición	N	Subconjunto						
		1	2	3	4	5	6	7
255.00	8	3.3575						
253.00	8	3.4813						
243.00	8	3.4925						
235.00	8	3.5750						
252.00	8		4.1025					
332.00	8			4.9150				
115.00	8			4.9200				
335.00	8			4.9313				
334.00	8			4.9600				
324.00	8			5.0838	5.0838			
323.00	8			5.1325	5.1325	5.1325		
121.00	8				5.2750	5.2750	5.2750	
131.00	8					5.3575	5.3575	
114.00	8						5.4738	
135.00	8							5.7475

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = .024.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

b. Alfa = .05.

## Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: a

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
	a				
Condición	74.803	14	5.343	42.545	.000
días	68.981	3	22.994	183.091	.000
Condición * días	262.973	42	6.261	49.856	.000
Error	7.535	60	.126		
Total	14722.988	120			
Total corregida	414.293	119			

a. R cuadrado = .982 (R cuadrado corregida = .964)

a

Tukey B<sup>a,b</sup>

Condicion	N	Subconjunto								
		1	2	3	4	5	6	7	8	
153.00	8	9.6375								
155.00	8	9.9300	9.9300							
252.00	8	10.0100	10.0100							
234.00	8	10.1550	10.1550	10.1550						
222.00	8		10.2200	10.2200						
322.00	8			10.6800	10.6800					
223.00	8				10.9650	10.9650				
243.00	8				10.9775	10.9775				
115.00	8				11.0375	11.0375				
323.00	8				11.0675	11.0675				
325.00	8					11.4325	11.4325			
324.00	8					11.5025	11.5025			
332.00	8						11.7100	11.7100		
121.00	8							12.0950	12.0950	12.0950
131.00	8									12.3750

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = .126.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

#### Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: b

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
	a				
Condicion	141.239	14	10.089	70.643	.000
dias	166.037	3	55.346	387.547	.000
Condicion * dias	276.510	42	6.584	46.100	.000
Error	8.569	60	.143		
Total	20179.495	120			
Total corregida	592.354	119			

a. R cuadrado = .986 (R cuadrado corregida = .971)

b

Tukey B<sup>a,b</sup>

Condicion	N	Subconjunto				
		1	2	3	4	5
224.00	8	11.3100				
255.00	8	11.4200				
123.00	8		12.0025			
132.00	8		12.0725	12.0725		
145.00	8		12.0775	12.0775		
225.00	8		12.1850	12.1850		
234.00	8		12.3125	12.3125		
235.00	8		12.3825	12.3825	12.3825	
134.00	8		12.4650	12.4650	12.4650	
124.00	8			12.6850	12.6850	
351.00	8				12.9550	
352.00	8					14.2825
353.00	8					14.3775
355.00	8					14.3875
354.00	8					14.7250

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = .143.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

b. Alf a = .05.

#### Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: L

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
	<sup>a</sup>				
Condicion	160.079	14	11.434	5.110	.000
dias	89.310	3	29.770	13.304	.000
Condicion * dias	878.270	42	20.911	9.345	.000
Error	134.261	60	2.238		
Total	123325.999	120			
Total corregida	1261.920	119			

a. R cuadrado = .894 (R cuadrado corregida = .789)

L

Tukey B<sup>a,b</sup>

Condicion	N	Subconjunto		
		1	2	3
145.00	8	29.7150		
155.00	8	30.6550	30.6550	
152.00	8	30.7875	30.7875	
153.00	8	30.8488	30.8488	
132.00	8	31.1325	31.1325	
255.00	8	31.4000	31.4000	
355.00	8	31.7325	31.7325	
312.00	8	32.0000	32.0000	
251.00	8		32.3925	32.3925
351.00	8		32.3925	32.3925
241.00	8		32.4475	32.4475
341.00	8		32.4475	32.4475
342.00	8		32.7875	32.7875
235.00	8		33.0825	33.0825
221.00	8			34.5825

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 2.238.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

b. Alfa = .05.

#### Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Cromaticidad

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
	<sup>a</sup>				
Condicion	268.872	14	19.205	62.450	.000
dias	80.416	3	26.805	87.164	.000
Condicion * dias	236.040	42	5.620	18.275	.000
Error	18.452	60	.308		
Total	42029.005	120			
Total corregida	603.780	119			

a. R cuadrado = .969 (R cuadrado corregida = .939)

## Cromaticidad

Tukey B<sup>a,b</sup>

Condicion	N	Subconjunto						
		1	2	3	4	5	6	7
155.00	8	16.6775						
232.00	8	16.7200						
153.00	8	16.7388						
252.00	8	16.7688						
253.00	8		17.6963					
243.00	8		18.2175	18.2175				
223.00	8		18.2925	18.2925				
114.00	8		18.4613	18.4613	18.4613			
323.00	8			18.8625	18.8625	18.8625		
324.00	8				19.1700	19.1700	19.1700	
131.00	8					19.4650	19.4650	
121.00	8					19.6950	19.6950	
335.00	8						19.8163	
344.00	8						19.9213	
334.00	8							22.1950

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = .308.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

b. Alfa = .05.

## Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: tonalidad

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
	<sup>a</sup>				
Condicion	2466.697	14	176.193	474.834	.000
dias	1165.681	3	388.560	1047.159	.000
Condicion * dias	3646.642	42	86.825	233.990	.000
Error	22.264	60	.371		
Total	346136.804	120			
Total corregida	7301.284	119			

a. R cuadrado = .997 (R cuadrado corregida = .994)

## tonalidad

Tukey B<sup>a,b</sup>

Condicion	N	Subconjunto										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
334.00	8	46.0288										
344.00	8		47.2450									
335.00	8			48.5150								
333.00	8				50.1650							
332.00	8				50.5425							
255.00	8				50.6775							
235.00	8					52.0363						
243.00	8						53.0463					
252.00	8						53.0763					
155.00	8						53.1538					
153.00	8							54.9875				
253.00	8								55.8588			
152.00	8									59.5575		
154.00	8										60.6538	
132.00	8											61.5238

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = .371.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

b. Alfa = .05.

## Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: pH

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
	a				
Condicion	4.459	14	.319	39.856	.000
dias	43.685	3	14.562	1822.105	.000
Condicion * dias	8.441	42	.201	25.149	.000
Error	.480	60	.008		
Total	4941.338	120			
Total corregida	57.065	119			

a. R cuadrado = .992 (R cuadrado corregida = .983)

## pH

Tukey B<sup>a,b</sup>

Condicion	N	Subconjunto				
		1	2	3	4	5
115.00	8	5.9538				
252.00	8		6.1500			
243.00	8		6.1800			
253.00	8		6.1900			
232.00	8		6.2500			
315.00	8		6.2875			
114.00	8			6.4338		
311.00	8			6.4525		
141.00	8			6.4800	6.4800	
341.00	8			6.4800	6.4800	
255.00	8			6.4900	6.4900	
354.00	8			6.5338	6.5338	6.5338
355.00	8			6.5513	6.5513	6.5513
145.00	8				6.6163	6.6163
144.00	8					6.6488

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = .008.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000

b. Alfa = .05.

## ANEXO 5

## Estimación de vida de anaquel

## Estimación de vida de anaquel de la birria de carne de ovino.

Para determinar la vida de anaquel de la birria, se tomaron en cuenta las variables de pH y rancidez. Después de que se determinó la velocidad específica  $\mu$ , para cada temperatura de prueba, 25 y a 37 ° C, después se graficó el logaritmo natural de  $\mu$ , de cada temperatura en este caso a, contra el inverso de la temperatura en grados Kelvin. A continuación en la figura 22, se muestra la gráfica de la velocidad específica  $\mu$  y la temperatura, para las variaciones de pH, donde se obtuvo la energía de activación, aplicando el modelo de Arrhenius. La vida de anaquel se determinó considerando el valor límite de pH de 4.6

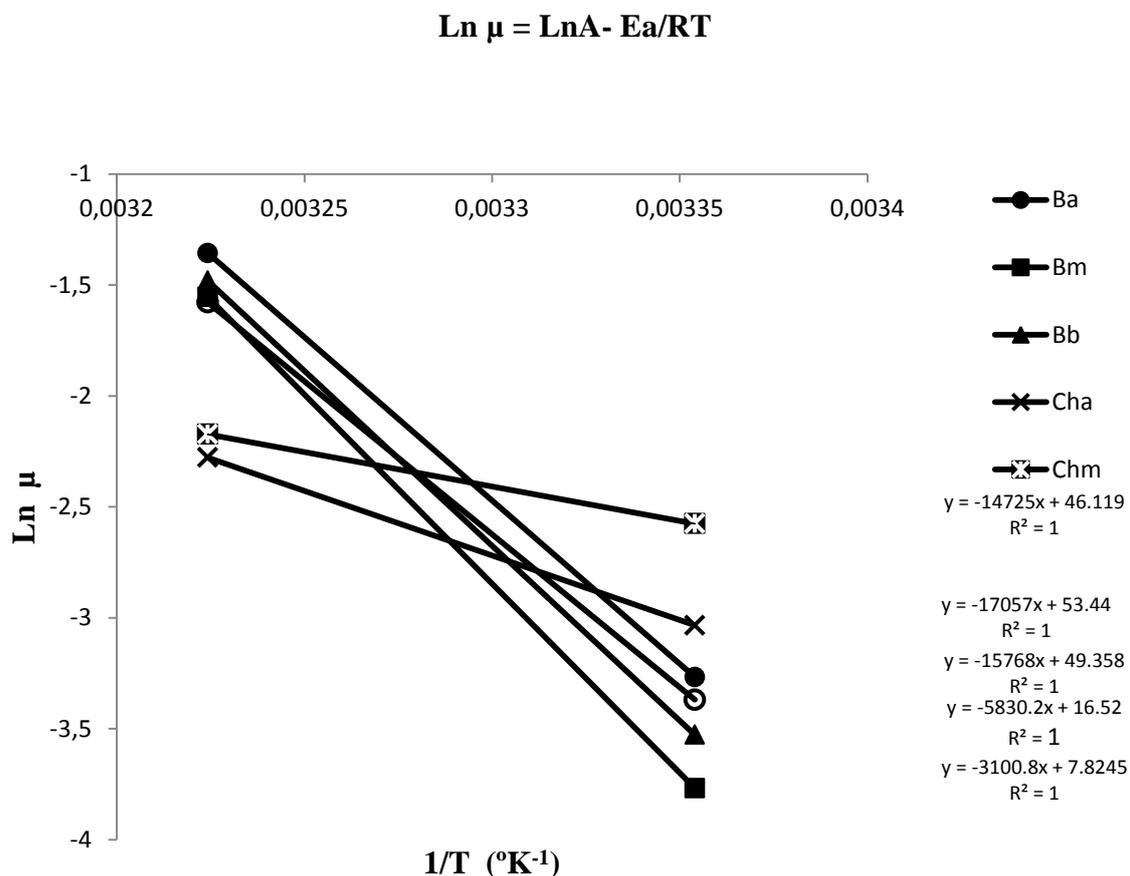


Figura 23. Velocidad específica  $\mu$  y temperatura para variaciones de pH.

A continuación en la figura 23, se muestra la gráfica de la velocidad específica  $\mu$  y la temperatura, para las variaciones de rancidez, donde se obtuvo la energía de activación, aplicando el modelo de Arrhenius. La vida de anaquel se determinó considerando el valor límite de absorbencia de 0.6.

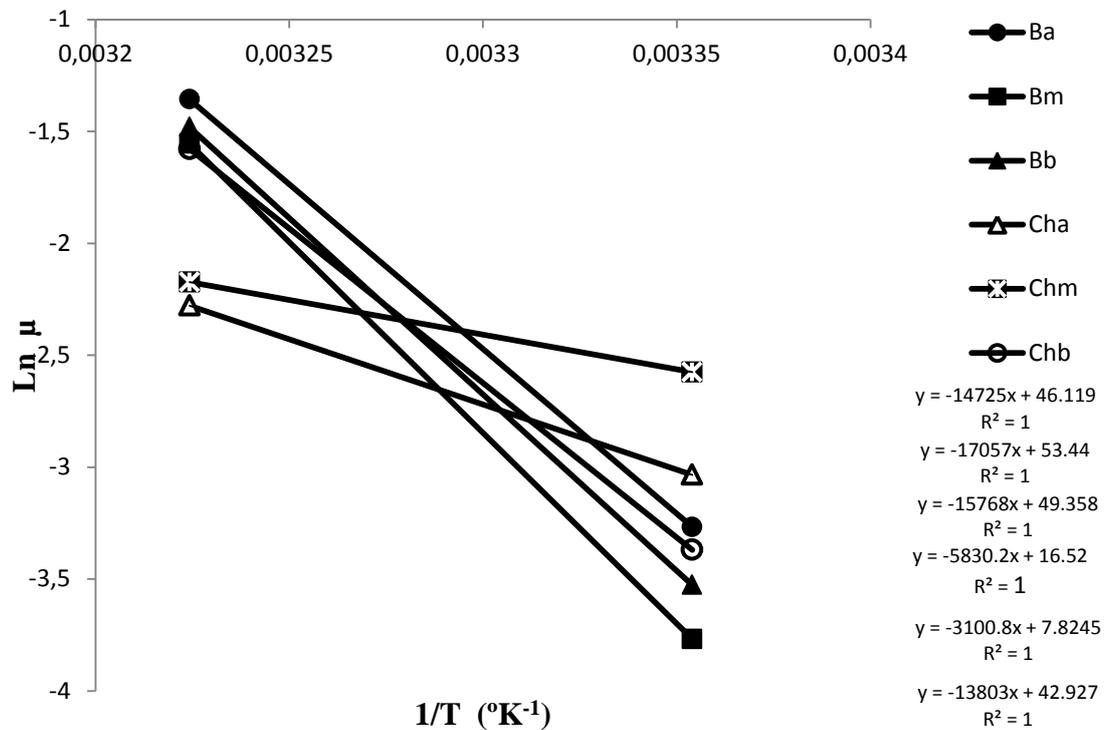


Figura 24. Velocidad específica  $\mu$  y temperatura para variaciones de rancidez.

### Estimación de vida de anaquel de fajitas marinadas de carne de ovino.

Para determinar la vida de anaquel las fajitas marinadas de carne de ovino, se tomaron en cuenta las variables de pH y rancidez. Se determinó la velocidad específica de crecimiento  $\mu$ , para cada temperatura de prueba, se graficó el logaritmo natural de  $\mu$ , de cada temperatura 4 y a 10 ° C, contra el inverso de la temperatura en grados Kelvin. A continuación en figura 24, se muestra la gráfica de la velocidad específica  $\mu$  y la temperatura, para las variaciones de cuenta viable de mesófilos, donde se obtuvo la energía de activación, aplicando el modelo de Arrhenius. La vida de anaquel se determinó considerando el valor límite de 6 ufc/mL.

$$\ln \mu = \ln A - E_a/RT$$

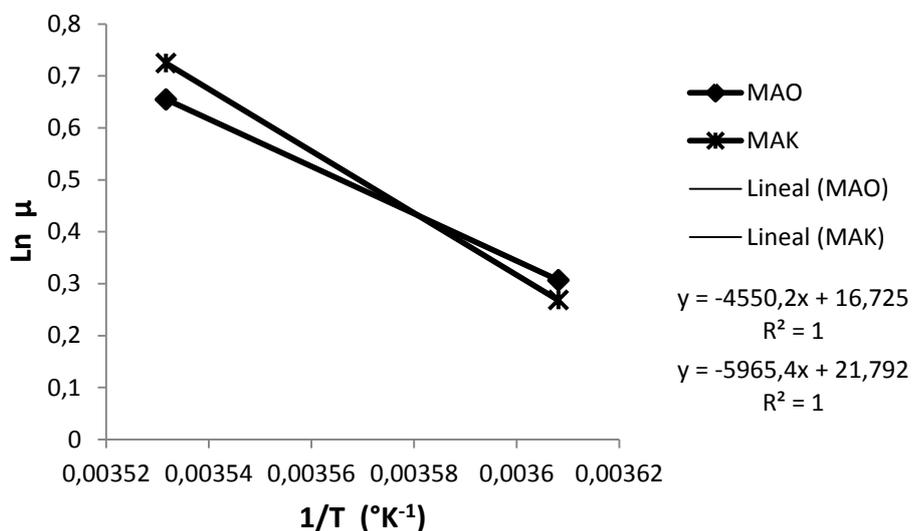


Figura 25. Velocidad específica  $\mu$  y temperatura para variaciones de cuenta viable de mesófilos.

Mientras que en la figura 25, se muestra la gráfica de la velocidad específica  $\mu$  y la temperatura, para las variaciones de pH, donde se obtuvo la energía de activación, aplicando el modelo de Arrhenius. La vida de anaquel se determinó considerando el valor límite de pH de 6.

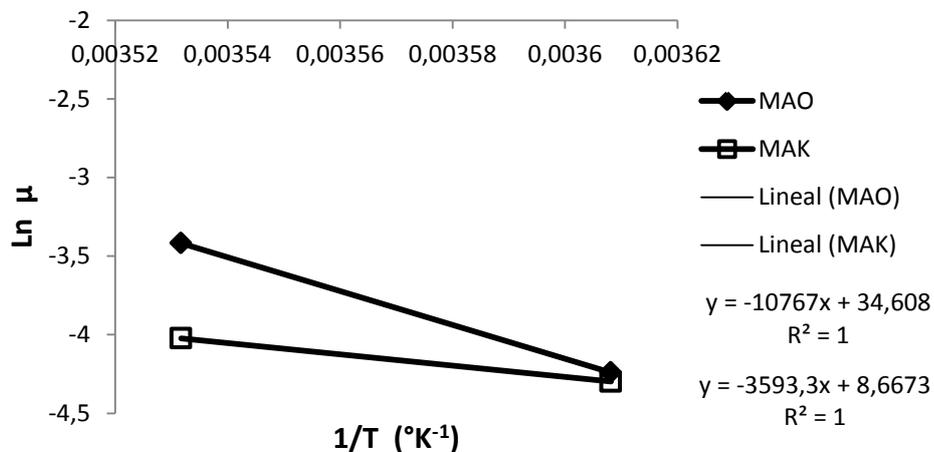


Figura 26. Velocidad específica  $\mu$  y temperatura para variaciones de pH.

Con lo que respecta a la diferencial de color (figura 26), la velocidad específica  $\mu$  y la temperatura, se graficaron, donde se obtuvo la energía de activación, aplicando el modelo de Arrhenius. La vida de anaquel se determinó considerando el valor límite de  $\Delta E$  de 4.5.

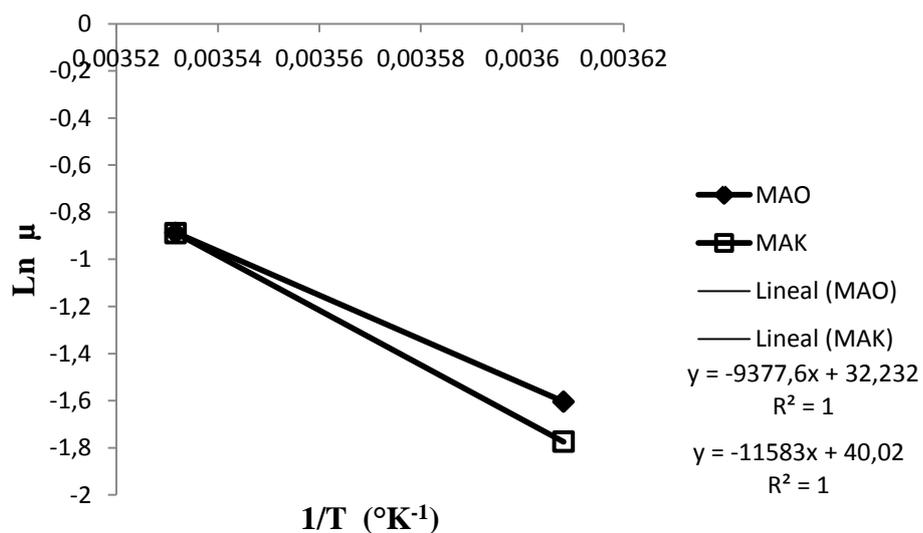


Figura 27. Velocidad específica  $\mu$  y temperatura para variaciones del diferencial de color.

Entretanto se observa en la figura 27, la gráfica de la velocidad específica  $\mu$  y la temperatura, para las variaciones de rancidez, donde se obtuvo la energía de activación, aplicando el modelo de Arrhenius. La vida de anaquel se determinó considerando el valor límite de absorbencia de 0.6.

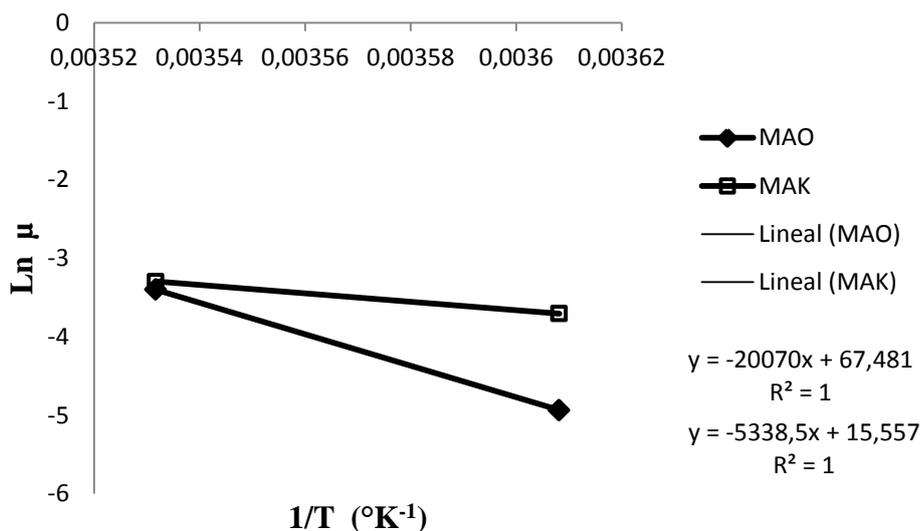


Figura 28. Velocidad específica  $\mu$  y temperatura para variaciones de rancidez.

### Estimación de vida de anaquel de hamburguesas de carne de ovino.

Para determinar la vida de anaquel hamburguesas de carne de ovino, se tomaron en cuenta las variables de cuenta viable de mesófilos, pH,  $\Delta E$  de color y rancidez. Se determinó la velocidad específica  $\mu$ , para cada temperatura de prueba 4, 10, -10 y -20  $^{\circ}\text{C}$ , se graficó el logaritmo natural de  $\mu$ , contra el inverso de la temperatura en grados Kelvin. A continuación en figura 28, se muestra la gráfica de la velocidad específica  $\mu$  y la temperatura, para las variaciones de cuenta viable de mesófilos, donde se obtuvo la energía de activación, aplicando el modelo de Arrhenius. La vida de anaquel se determinó considerando el valor límite de 6 ufc/mL.

$$\ln \mu = \ln A - E_a/RT$$

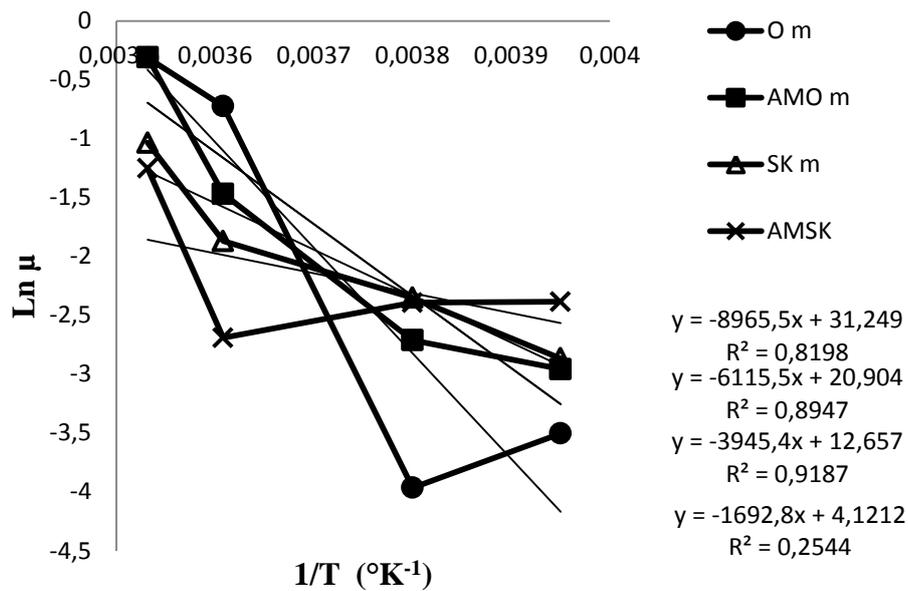


Figura 29. Velocidad específica  $\mu$  y temperatura para variaciones de cuenta viable de mesófilos.

En la figura 29, se muestra la gráfica de la velocidad específica  $\mu$  y la temperatura, para las variaciones de pH, donde se obtuvo la energía de activación, aplicando el modelo de Arrhenius. Se determinó la vida de anaquel de la hamburguesa de carne de ovino, considerando el valor límite de pH de 6.

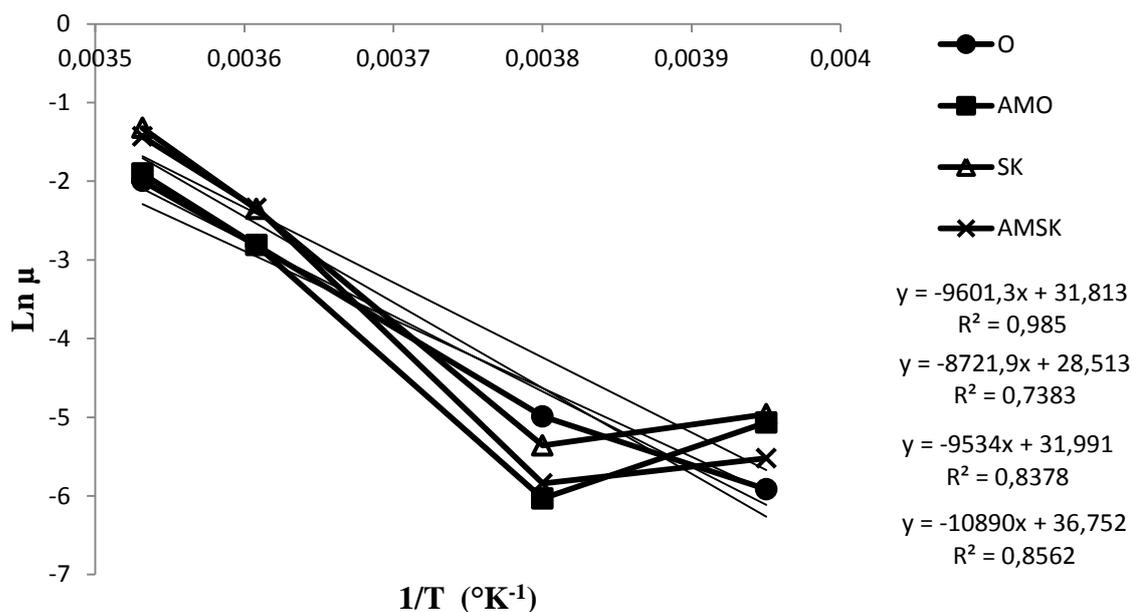


Figura 30. Velocidad específica  $\mu$  y temperatura para variaciones de pH

Se observa en la figura 30, la gráfica de la velocidad específica  $\mu$  y la temperatura, para las variaciones del diferencial de color, donde se obtuvo la energía de activación, aplicando el modelo de Arrhenius. La vida de anaquel de la hamburguesa de carne de ovino, se determinó considerando el valor límite  $\Delta E$  de 4.5.

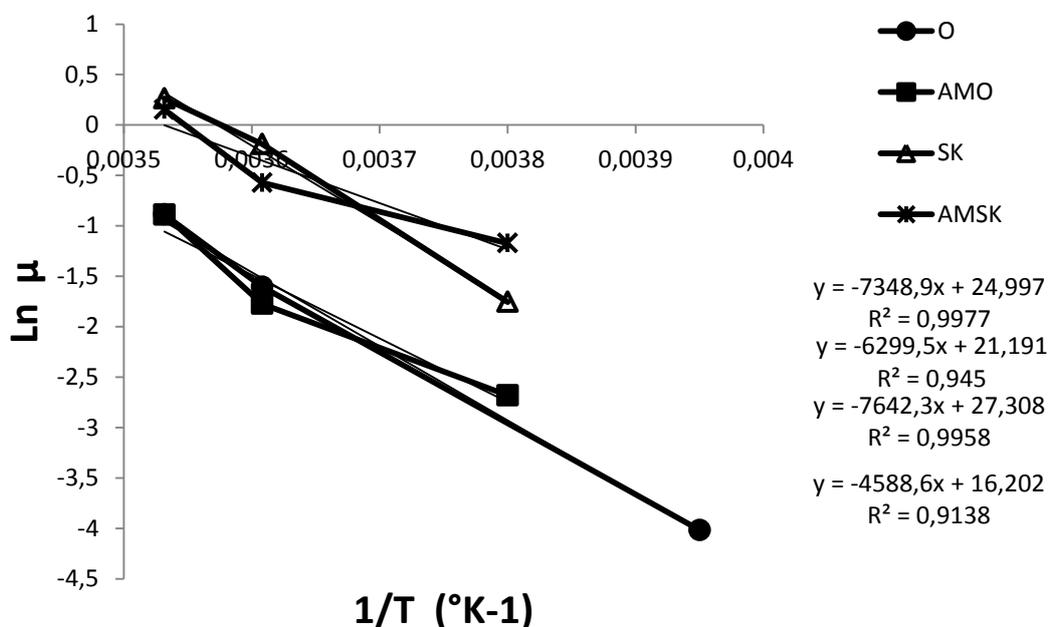


Figura 31. Velocidad específica  $\mu$  y temperatura para variaciones del diferencial del color.

En la figura 31, se observa la gráfica de la velocidad específica  $\mu$  y la temperatura, para las variaciones de rancidez, donde se obtuvo la energía de activación, aplicando el modelo de Arrhenius. Determinando la vida de anaquel de la hamburguesa, considerando el valor límite de absorbencia de 0.6.

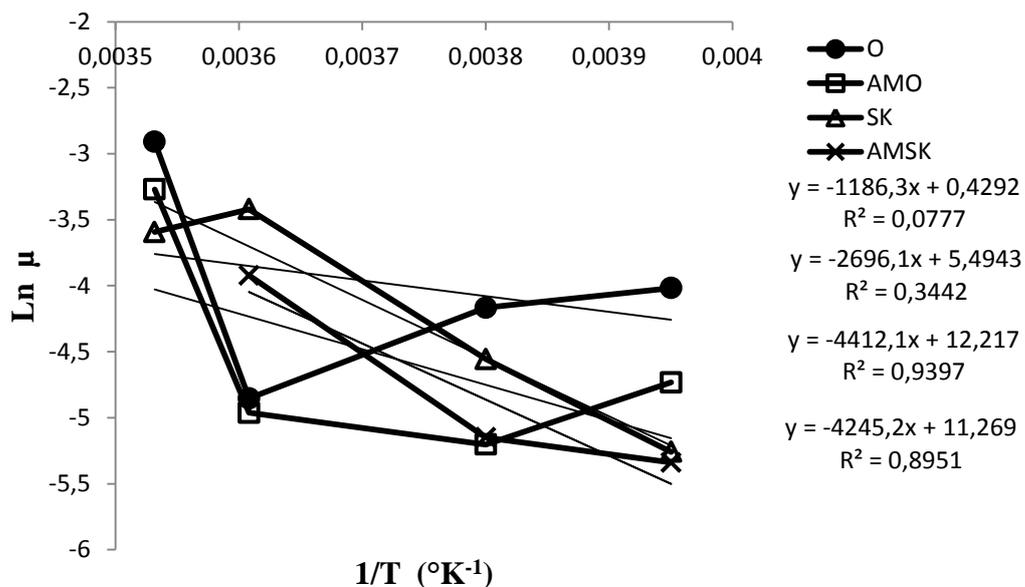


Figura 32. Velocidad específica  $\mu$  y temperatura para variaciones de rancidez.