

Información Importante

La Universidad de La Sabana informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea de la Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad de La Sabana.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento para todos los usos que tengan finalidad académica, nunca para usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le de crédito al documento y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, La Universidad de La Sabana informa que los derechos sobre los documentos son propiedad de los autores y tienen sobre su obra, entre otros, los derechos morales a que hacen referencia los mencionados artículos.

BIBLIOTECA OCTAVIO ARIZMENDI POSADA
UNIVERSIDAD DE LA SABANA
Chía - Cundinamarca

**EFFECTO DE LA BACTERIA ÁCIDO LÁCTICA B2® COMO BIOPRESERVANTE,
SOBRE LOS PATÓGENOS DE INTERÉS, LA MICROBIOTA NATURAL Y LAS
PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS EN UN PRODUCTO CÁRNICO TERMINADO**

NATALIA RODRÍGUEZ AGUDELO

**UNIVERSIDAD DE LA SABANA
FACULTAD DE INGENIERÍA
CHÍA
2013**

**EFFECTO DE LA BACTERIA ÁCIDO LÁCTICA B2® COMO BIOPRESERVANTE,
SOBRE LOS PATÓGENOS DE INTERÉS, LA MICROBIOTA NATURAL Y LAS
PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS EN UN PRODUCTO CÁRNICO TERMINADO.**

NATALIA RODRÍGUEZ AGUDELO

**Directora
Indira Sotelo Díaz
Ph.D en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

**Codirectora
Clementina Cueto Vigil
M.Sc. en Ciencias**

**UNIVERSIDAD DE LA SABANA
FACULTAD DE INGENIERÍA
CHÍA
2013**

Agradecimientos

En primer lugar agradezco a Dios por darme siempre las fuerzas para continuar en lo adverso y darme sabiduría en las situaciones difíciles. Agradezco a mis padres con todo mi cariño y amor por su apoyo, motivación y lucha que hicieron que pudiera alcanzar mis sueños y lograra conquistar este peldaño más en mi vida.

Agradezco a la Universidad de La Sabana y especialmente a mi directora Indira Sotelo y Codirectora Clementina Cueto por todo su apoyo y dirección en el proceso de construcción de este trabajo y por su orientación a nivel personal y laboral.

Colciencias - Proyecto 221-2010

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	10
1 INTRODUCCIÓN	12
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
1.2 JUSTIFICACIÓN Y ANTECEDENTES	15
1.3 OBJETIVOS.....	20
1.3.1 Objetivo General.....	20
1.3.2 Objetivos Específicos.....	20
1.4 HIPOTESIS.....	20
2 MARCO TEÓRICO	21
2.1 BIOPRESERVACIÓN.....	21
2.1.1 Biopreservación con bacteriocinas	22
2.1.2 Biopreservación con cepas no productoras de bacteriocinas	22
2.2 BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS (BAL)	24
2.2.1 Lactobacillus sakei.....	25
2.3 MICROORGANISMOS PATÓGENOS DE INTERÉS PARA PRODUCTOS CÁRNICOS COCIDOS	26
2.3.1 Listeria monocytogenes	27
2.3.2 Escherichia coli.....	28
2.3.3 Staphylococcus aureus	29
2.3.4 Salmonella enteritidis	29
2.3.5 Microbiota natural de un producto cárnico cocido.....	30
2.4 PRODUCTOS CÁRNICOS COCIDOS	31
2.5 MODELOS PREDICTIVOS.....	33
2.5.1 Modelo Baranyi & Roberts.....	34
2.5.2 Modelo de Gompertz modificado	35
3 DISEÑO METODOLÓGICO	36
3.1 SELECCIÓN DE LA CEPA.....	36
3.2 ESTANDARIZACIÓN DE INÓCULOS Y MEDIOS DE CULTIVO	36
3.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA BAL A NIVEL <i>IN VITRO</i>	37
3.3.1 Evaluación del efecto de B2® sobre cada patógeno.....	38
3.3.2 Evaluación del efecto de B2® sobre co-cultivos de patógenos	38
3.4 ESTIMACIÓN DE LOS PARAMETROS DE CRECIMIENTO.....	39
3.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE B2® EN UN PRODUCTO CÁRNICOCOCIDO	39
3.5.1 Evaluación del efecto de la B2® sobre las propiedades fisicoquímicas de un producto cárnico cocido	

3.5.2	Evaluación del efecto de B2® sobre la microbiota natural de un producto cárnico cocido	41
3.5.3	Evaluación del efecto de B2® sobre L. monocytogenes en un producto cárnico cocido	42
3.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	43
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
4.1	BAL BIOPRESERVANTE SELECCIONADA	44
4.2	EFEECTO DE B2® A NIVEL <i>IN VITRO</i> A 8 °C	45
4.2.1	Efecto de B2® sobre cada patógeno	46
4.2.2	Efecto de B2® sobre co-cultivos de patógenos a 8 °C.....	55
4.3	EFEECTO DE B2® EN UN PRODUCTO CÁRNICO COCIDO	61
4.3.1	Comportamiento de B2® en un producto cárnico cocido.	61
4.3.2	Efecto de B2® sobre las propiedades fisicoquímicas de un producto cárnico cocido	62
4.3.3	Efecto de B2® sobre la microbiota natural de un producto cárnico cocido.....	74
4.3.4	Efecto de B2® sobre L. monocytogenes en un producto cárnico cocido.....	76
5	CONCLUSIONES	78
6	RECOMENDACIONES	80
7	BIBLIOGRAFÍA	81
8	ANEXOS.....	89
8.1	COEFICIENTES DE CORRELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES PARA LOS TRES TRATAMIENTOS EVALUADOS EN EL NUMERAL 4.3.1	89
8.2	PERFILES ELECTROFORÉTICOS DE LOS TRES TRATAMIENTOS EVALUADOS EN EL NUMERAL 4.3.1	92
8.3	FICHA TÉCNICA DE B2®	95
8.4	CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NaNO ₂ EN ppm VS ABSORBANCIA A 540 NM.	97
8.5	SOCIALIZACIONES.....	98
8.5.1	Efecto antimicrobiano de una cepa comercial biopreservante a 8 °C frente a L. monocytogenes en dos concentraciones de nitrito de sodio – V Congreso Internacional de Microbiología Industrial – Pontifica Universidad Javeriana.	98
8.5.2	Efecto antimicrobiano de una cepa comercial biopreservante a 8 °C frente a L. monocytogenes en dos concentraciones de nitrito de sodio – XV National Congress of Biotechnology and Bioengineering – Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería.	99
8.5.3	Efecto antimicrobiano de una cepa comercial biopreservante a 8 °C frente a dos co-cultivos de L. monocytogenes con E. coli y S. aureus – VI Jornada de Socialización de Resultados de Investigación	100
8.5.4	Efecto de la cepa biopreservante L. sakei, sobre las propiedades fisicoquímicas de un producto cárnico cocido a 8 °C - 9 Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos CIBIA – 9.....	101

LISTA DE TABLAS

<i>Tabla 1. Condiciones de crecimiento mínimas para patógenos y microorganismos deteriorativos asociados a productos cárnicos cocidos.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabla 2. Requisitos microbiológicos para derivados cárnicos procesados cocidos.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabla 3. Parámetros de crecimiento para los cuatro patógenos evaluados en monocultivo y co-cultivo con la cepa B2® obtenidos por el modelo de Baranyi & Roberts y el modelo de Gompertz.....</i>	<i>51</i>
<i>Tabla 4. Parámetros de crecimiento para los tres co-cultivo y los respectivos controles obtenidos por el modelo de Baranyi & Roberts</i>	<i>58</i>
<i>Tabla 5. Parámetros de crecimiento de B2® y mesófilos totales en un producto cárnico</i>	<i>76</i>
<i>Tabla 6. Parámetros de crecimiento de B2® y L. monocytogenes a nivel in vitro y en producto</i>	<i>77</i>
<i>Tabla 7. Coeficientes de correlación para el tratamiento 1 (Producto pasteurizado + B2®)</i>	<i>89</i>
<i>Tabla 8. Coeficientes de correlación para el tratamiento 2 (Producto pasteurizado).....</i>	<i>90</i>
<i>Tabla 9. Coeficientes de correlación para el tratamiento 3 (Producto sin pasteurizar).....</i>	<i>91</i>

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Principales cepas y bacteriocinas biopreservantes</i>	<i>16</i>
<i>Figura 2. Principales enfoques en los estudios de biopreservación</i>	<i>18</i>
<i>Figura 3. Tipos de inhibición</i>	<i>24</i>
<i>Figura 4. Rutas metabólicas (homoláctica y heteroláctica) – Tomado de: Sobrino, 1993</i>	<i>26</i>
<i>Figura 5. Halos de inhibición de diferentes bioprotectores sobre los cuatro patógenos de interés – Tomado de: Primer Informe de Avances del Proyecto Embutidos Biopreservados 221-2010 de Colciencias</i>	<i>45</i>
<i>Figura 6. Curva de crecimiento de B2 en monocultivo a tres concentraciones de nitritos.....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 7. Curva de crecimiento de L. monocytogenes en monocultivo y cocultivo con B2® a tres concentraciones de nitritos.....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 8. Curva de crecimiento de S. enteritidis en monocultivo y cocultivo con B2® a dos concentraciones de nitritos.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 9. Curva de crecimiento de E. coli en monocultivo y cocultivo con B2® a 100 ppm de nitritos.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 10. Curva de crecimiento de S. aureus en monocultivo y cocultivo con B2® a 100 ppm de nitritos</i>	<i>51</i>
<i>Figura 11. Curvas de crecimiento para el co-cultivo 1 a 100 ppm de nitritos.....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 12. Curvas de crecimiento para el co-cultivo 2 a 100 ppm de nitritos.....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 13. Curvas de crecimiento para el co-cultivo 3 a 100 ppm de nitritos.....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 14. Recuento de B2® para el tratamiento 1 y recuento de mesófilos totales para los tratamiento 2 y 3, durante 50 días a 8 °C.</i>	<i>62</i>
<i>Figura 15. Seguimiento de pH, para los tres tratamientos durante 50 días a 8 °C.....</i>	<i>65</i>
<i>Figura 16. Seguimiento del % de sinéresis para los tres tratamientos, durante 50 días a 8 °C.</i>	<i>65</i>
<i>Figura 17. Seguimiento a la concentración de proteínas sarcoplásmicas para los tres tratamientos, durante 50 días a 8 °C.....</i>	<i>67</i>
<i>Figura 18. Perfiles electroforéticos del tratamiento 1 (Producto pasteurizado + B2®) en el tiempo (50 días).....</i>	<i>67</i>
<i>Figura 19. Seguimiento de la concentración de nitritos para los tres tratamientos, durante 50 días a 8 °C.....</i>	<i>69</i>
<i>Figura 20. Seguimiento a la luminosidad (L) para los tres tratamientos, durante 50 días a 8 °C.....</i>	<i>69</i>

<i>Figura 21. Seguimiento a la intensidad del color rojo (a) para los tres tratamientos, durante 50 días a 8 °C</i>	<i>70</i>
<i>Figura 22. Seguimiento a la intensidad del color amarillo (b) para los tres tratamientos, durante 50 días a 8 °C</i>	<i>70</i>
<i>Figura 23. Seguimiento del cambio de color (DE*), para los tres tratamientos, durante 50 días a 8 °C.....</i>	<i>71</i>
<i>Figura 24. Seguimiento a la dureza para los tres tratamientos, durante 50 días a 8 °C.....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 25. Seguimiento a la adhesividad para los tres tratamientos, durante 50 días a 8 °C.....</i>	<i>73</i>
<i>Figura 26. Seguimiento a la gomosidad para los tres tratamientos, durante 50 días a 8 °C.....</i>	<i>73</i>
<i>Figura 27. Seguimiento a la cohesividad para los tres tratamientos, durante 50 días a 8 °C.....</i>	<i>74</i>
<i>Figura 28. Efecto de B2® sobre la microbiota natural de un producto cárnico cocido a 8 °C.....</i>	<i>75</i>
<i>Figura 29. Efecto de B2® sobre L. monocytogenes en un producto cárnico cocido a 8 °C.....</i>	<i>77</i>
<i>Figura 30. Perfil electroforético de los tres tratamientos en el día 0</i>	<i>92</i>
<i>Figura 31. Perfil electroforético de los tres tratamientos en el día 10</i>	<i>92</i>
<i>Figura 32. Perfil electroforético de los tres tratamientos en el día 20</i>	<i>93</i>
<i>Figura 33. Perfil electroforético de los tres tratamientos en el día 32</i>	<i>93</i>
<i>Figura 34. Perfil electroforético de los tres tratamientos en el día 39</i>	<i>94</i>
<i>Figura 35. Perfil electroforético de los tres tratamientos en el día 50</i>	<i>94</i>

RESUMEN

Para la industria de productos cárnicos cocidos, específicamente en productos listos para el consumo como salchichas, mortadela y jamón, el crecimiento de microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* debe estar en continuo control, ya que podrían encontrarse como resultado de la contaminación cruzada en las operaciones de corte y empaque que se llevan a cabo después del proceso de cocción, el cual tiene como objetivos: coagulación de las proteínas, inactivación de enzimas, desarrollo de las características organolépticas deseadas y reducción del número de microorganismos. Así, la biopreservación es un método que busca disminuir la carga microbiana no deseada de un producto, después del proceso de cocción, por medio del uso de microorganismos con capacidad antimicrobiana. El empleo de estas cepas biopreservantes comerciales a nivel industrial requiere de procesos de validación en las diferentes matrices alimentarias sobre las cuales se quieran aplicar.

Este trabajo se encuentra enmarcado en el Proyecto 221 – 2010 de Colciencias y tuvo como objetivo evaluar el efecto de la cepa B2® sobre cuatro patógenos (*L. monocytogenes*, *S. enteritidis*, *E. coli* y *S. aureus*), la microbiota natural y las propiedades fisicoquímicas y sensoriales en un producto cárnico cocido. El diseño metodológico se dividió en cuatro fases: 1. selección de la cepa biopreservante; 2. estandarización de los inóculos iniciales y medios de cultivo; 3. evaluación del efecto de B2® a nivel *in vitro* y 4: evaluación del efecto de B2® en un producto cárnico cocido. Después del desarrollo del diseño metodológico, se determinó que la cepa B2® en combinación con la aplicación de nitritos prolongaron la fase Lag de *L. monocytogenes* en 11 días a nivel *in vitro* y en la evaluación en producto la aplicación de esta cepa biopreservante inactivó las células de *L. monocytogenes* a un nivel menor al límite de detección. En la evaluación sobre las propiedades fisicoquímicas del producto se

observó que la cepa B2® generó un descenso rápido del pH, provocando una disminución de la concentración de nitritos y aumento del porcentaje de sinéresis. La cepa biopreservante B2®, prolongó la fase Lag de la microbiota natural del producto en dos días. *E. coli* y *S. aureus* presentaron inactivación en monocultivo y en co-cultivo con B2®, esto pudo deberse a que estos patógenos no se encontraban en las condiciones de pH, temperatura y Aw óptimas de crecimiento.

1 INTRODUCCIÓN

Entre los principales alimentos listos para el consumo se encuentran los productos cárnicos cocidos, los cuales incluyen una amplia variedad, tales como salchichas, mortadela, jamón, etc.; los cuales son fabricados a partir emulsiones cárnicas que debido a su pH y A_w , son el medio propicio para el crecimiento de microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella entérica*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* (Uyttendaele *et al.*, 1999). Aunque el procesamiento térmico ejerce control sobre estos microorganismos patógenos, este tipo de alimentos son susceptibles a la contaminación cruzada generada durante el corte y el envasado (Hwang y Huang, 2010, Liu *et al.*, 2012).

La biopreservación es un método que busca disminuir la carga microbiana no deseada de un producto, por medio del uso de microorganismos con capacidad antimicrobiana y de esta manera ayudar a prolongar su vida útil. Dentro de los microorganismos utilizados para la biopreservación de productos cárnicos cocidos se encuentran las bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales producen una serie de metabolitos, que inhiben el crecimiento de otras bacterias, entre ellas patógenos asociados a alimentos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli*, (Holzapfel *et al.*, 1995, Vermeiren *et al.*, 2004).

De acuerdo con lo anterior, este proyecto, tuvo como objetivo evaluar el efecto de la bacteria ácido láctica B2® sobre cuatro patógenos, la microbiota natural y las propiedades fisicoquímicas y sensoriales en un producto cárnico cocido.

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los productos listos para el consumo como los derivados cárnicos, son alimentos altamente perecederos debido a su composición, contenido de agua y pH, que favorecen la proliferación microbiana y la diseminación de ETAS¹ (Hu *et al.*, 2008), puesto que no tienen un proceso riguroso de cocción antes de consumirlos. Según la OMS², los alimentos frescos, los pescados, las carnes y sus derivados y las aves conforman el grupo de alimentos asociados a ETAS. Entre los principales microorganismos asociados a ETAS, se encuentran *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *E. coli* O157:H7, entre otros, los cuales son considerados de interés para la seguridad alimentaria debido a que su presencia en los alimentos listos para el consumo, implican un peligro para la salud del consumidor por sus características patógenas y por su capacidad toxínogénica (Dos Santos, 2007).

La contaminación de los productos cárnicos listos para el consumo se puede dar por diferentes fuentes, como la carne cruda utilizada para la fabricación de estos productos, el entorno de procesamiento, los equipos de procesamiento y los trabajadores dedicados a la fabricación (Hwang y Huang, 2010), pero una de las principales causas de la proliferación microbiana en los productos cárnicos cocidos es la manipulación después del tratamiento térmico a 65 – 75 °C, en procesos adicionales como el corte, el envasado y el transporte donde el producto entra en contacto de nuevo con los equipos de procesamiento e instalaciones posiblemente contaminadas como filtros de aire, aguas estancadas y condensado de los techos. Al contaminarse estos productos con un microorganismo patógeno como *L. monocytogenes*, éste puede alcanzar niveles peligrosos durante el almacenamiento y el transporte desde las instalaciones de producción a los distribuidores al por menor, incluso a temperaturas de refrigeración (Hwang y Huang, 2010, Liu *et al.*, 2012).

¹ ETAS: Enfermedades transmitidas por alimentos

² OMS: Organización Mundial de la Salud

Según Samelis *et al.*, (2000), los microorganismos totales en el producto final pueden estar alrededor de 0,5 a 2 log UFC/g de producto y uno de los principales patógenos que se pueden encontrar como resultado de la recontaminación en estos productos es *Listeria monocytogenes* (Uyttendaele *et al.*, 1999 y Vermeiren, 2006); debido a que es un microorganismo difícil de controlar y eliminar en las plantas de alimentos, por su naturaleza ubicua, alta tolerancia al calor, sobrevivencia y capacidad de multiplicarse a temperaturas de refrigeración en la presencia o ausencia de oxígeno y soportar un amplio rango de pH (4.1 a 9.6) y concentraciones de sal de hasta 12% al 13%, además de formar biopelículas en diversas superficies (Dos Santos, 2007, Hwang y Huang, 2010).

De acuerdo con lo anterior, para este estudio, se planteó la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es el efecto de una cepa biopreservante comercial, sobre la microbiota natural y deteriorativa y las propiedades fisicoquímicas de un producto cárnico terminado?

1.2 JUSTIFICACIÓN Y ANTECEDENTES

Colombia es un importante productor de ganado, ubicándose entre los primeros once a nivel mundial, en el año 2003 la actividad ganadera (carne y leche) representó el 26% del valor de la producción agropecuaria nacional y el 62% del sector pecuario. El 62% de esta producción se destinó a la preparación de carnes frías, embutidos y jamones (Espinal *et al.*, 2005).

Adicionalmente, los consumidores demandan alimentos mínimamente procesados y sin aditivos químicos, lo que ha llevado a la búsqueda de conservantes naturales eficaces (Castro *et al.*, 2011). Una de las alternativas es la biopreservación, la cual ha cobrado gran interés como herramienta para controlar de forma natural la vida útil y la inocuidad de los productos cárnicos cocidos, mediante el uso de microorganismos antagónicos o sus productos metabólicos certificados como GRAS³. Algunas bacterias Gram-positivas, como las bacterias ácido lácticas producen sustancias antibacterianas o bacteriocinas que pueden inhibir el crecimiento de otros tipos de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Holzapfel *et al.*, 1995, Vermeiren *et al.*, 2004, 2006, Cizeikiene *et al.*, 2013). En un estudio realizado por Tecnova (2013), se identificaron las cepas y bacteriocinas más utilizadas en biopreservación de productos cárnicos, las cuales se relacionan en la figura 1.

³ GRAS: Generally Recognized As Safe – Designación dada por la FDA, a aditivos químicos o biológicos para ser usados en alimentos

CEPAS Y BACTERIOCINAS BIOPRESERVANTES

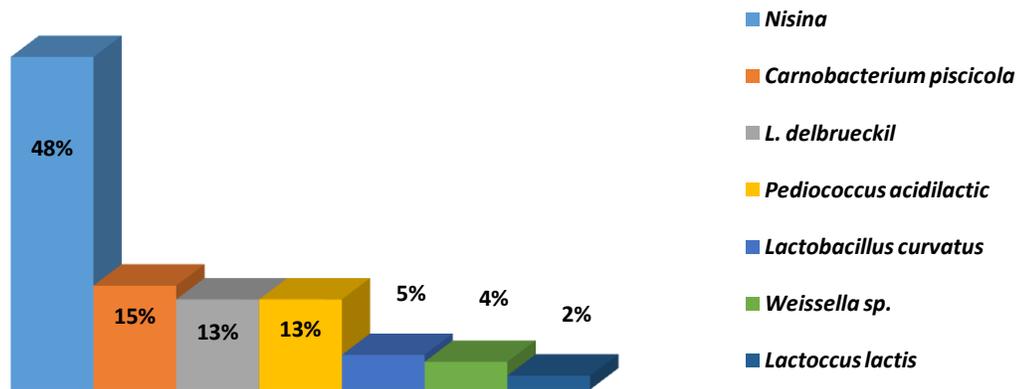


Figura 1. Principales cepas y bacteriocinas biopreservantes⁴

Partiendo de lo anterior, se realizó una revisión bibliográfica de los estudios que se han hecho sobre biopreservación en productos cárnicos y se determinó que las BAL utilizadas para biopreservación han sido aisladas principalmente de los productos cárnicos, un ejemplo es el estudio realizado por Amezcuita y Brashears (2002), quienes aislaron 49 cepas de BAL de productos cárnicos y evaluaron su capacidad para inhibir *Listeria monocytogenes* a 5 °C, de estas identificaron tres cepas como inhibidoras (*Pediococcus acidilactic*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei*). De igual forma Vermeiren *et al.* (2004), aislaron 91 cepas de BAL de productos cárnicos y 12 fueron seleccionadas como cepas bioprotectoras por su carácter psicrotrofas, tolerancia salina y su capacidad antimicrobiana sobre *Listeria monocytogenes* y otros microorganismos asociados a los productos cárnicos cocidos y una de las cepas fue identificada como *L. sakei* subespecie *carosus*.

Para el 2004 el Office of Food Additive Safety (HFS-200), certificó el uso de las cepas comerciales de *Carnobacterium maltaromaticum* CB1, CB2, CB3, LV17, UAL26

⁴ Fuente: Tecnova. 2013. Informe de análisis de inteligencia competitiva en proyectos universidad empresa cofinanciados por Colciencias. Proyecto: Elaboración de Embutidos Cárnicos Bioconservados. pp 80

producidas por Griffith Center en alimentos cárnicos listos para el consumo y frescos como GRAS y cepas inhibidoras de *Listeria monocytogenes*; el nivel máximo al cual se pueden inocular es 10^4 UFC/g de producto.

En un estudio más específico hecho por Alves *et al*, 2006, evaluaron el efecto sobre *L. monocytogenes* de dos cepas de *Lactobacillus sakei*, una productora de bacteriocina y aislada de salchicha de cerdo brasileña y *L. sakei* ATCC 15521 como cepa no productora de bacteriocina, aplicadas en rebanadas de jamón cocido empacado al vacío y determinaron que *L. monocytogenes* se inhibió significativamente en presencia de las dos cepas de *L. sakei*, pero la cepa productora de bacteriocina no presentó un efecto inhibidor adicional sobre la cepa de *L. monocytogenes*, por lo que concluyen que la inhibición de *L. monocytogenes* se dio básicamente por la competencia de nutrientes y la producción de ácido láctico.

Otra tendencia que se observó en la revisión bibliográfica fue la combinación de tecnologías para inhibir el crecimiento de patógenos, un ejemplo es el estudio realizado por Jofre, *et al.*, (2008), en el cual evaluaron la eficacia de la combinación de altas presiones (HPP) a 600 MPa con antimicrobianos naturales como la nisina y lactato de potasio en rebanadas de jamón cocido a 1 y 6 °C para inhibir el crecimiento de *Salmonella enteritidis sp.*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, después de 3 meses de almacenamiento, concluyeron que la combinación de HPP, la nisina y la refrigeración a 6 °C disminuyó los niveles de *S. aureus* en 2.4 log UFC/g.

Castro, *et al.*, (2011), aislaron 141 cepas de BAL de muestras artesanales de embutidos secos de Chaco – Argentina, de las cuales 27 cepas mostraron actividad antimicrobiana frente a *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* y *Brochothrix spp* y una de estas cepas fue identificada como *Lactobacillus curvatus / sakei*.

De acuerdo con la revisión bibliográfica realizada se determinó que los principales estudios de biopreservación en productos cárnicos se han enfocado en aislar BAL que se encuentran normalmente en los productos cárnicos, determinar su capacidad antimicrobiana frente a los principales patógenos e identificarlas. Adicionalmente se han realizado estudios para evaluar la eficiencia de la combinación de tecnologías para la inhibición de patógenos, métodos de aplicación y evaluación de la calidad sensorial en los productos tratados, como se muestra en la figura 2, (Tecnova, 2013).

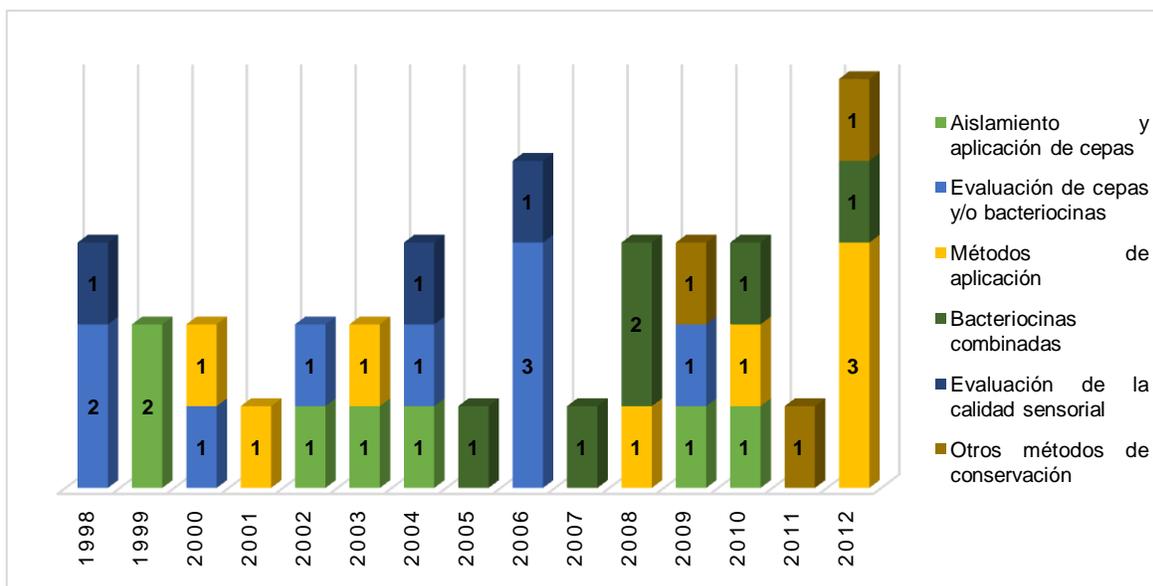


Figura 2. Principales enfoques en los estudios de biopreservación⁵

El uso de una cepa biopreservante debe considerarse sólo como una medida adicional a las Buenas Prácticas de Manufactura durante el procesamiento, almacenamiento y distribución de productos cárnicos y su aplicación industrial debe ser antes validada ya que esta debe cumplir con características específicas como su efecto inhibitorio a bajas temperaturas y causar un efecto insignificante en el pH de los productos tratados;

⁵ Fuente: Tecnova. 2013. Informe de análisis de inteligencia competitiva en proyectos universidad empresa cofinanciados por Colciencias. Proyecto: Elaboración de Embutidos Cárnicos Bioconservados. pp 80

dentro de la evaluación se debe considerar que los productos cárnicos cocidos son matrices complejas con un gran número de factores que pueden influir o afectar el crecimiento de la cepa bioprotectora como los componentes de la formulación, la inactivación de las bacteriocinas por las proteasas endógenas de la carne o la adsorción de las bacteriocinas por la grasa o la carne. Adicional a lo anterior, la cepa biopreservante puede generar cambios no deseados en el producto como cambios sensoriales con respecto a sabor, color, textura o la degradación de las proteínas (Vázquez, *et al.*, 2009).

De acuerdo con lo anterior, este proyecto busca determinar el efecto de la aplicación de una cepa biopreservante comercial⁶ frente a cuatro patógenos y la microbiota natural del producto cárnico cocido listo para el consumo, en almacenamiento a temperaturas de abuso de refrigeración; así como la influencia sobre las propiedades fisicoquímicas del producto a temperaturas de abuso de refrigeración durante 50 días de almacenamiento. Esta investigación hace parte del Proyecto 221 – 2010 de Colciencias, del cual hace parte una empresa productora de embutidos cárnicos, que requiere conocer las implicaciones de la aplicación de la cepa biopreservante como barrera de crecimiento de microorganismos patógenos, en los productos cárnicos listos para el consumo.

⁶ La selección de esta cepa biopreservante, se realizó en estudios preliminares dentro del marco del proyecto 221-2010 de Colciencias y se describe en los numerales 3.1 y 4.1

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 *Objetivo General*

Evaluar el efecto de la bacteria ácido láctica (BAL) B2® sobre cuatro patógenos, la microbiota natural y las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de un producto cárnico terminado

1.3.2 *Objetivos Específicos*

- Evaluar el comportamiento de la BAL B2®, sobre *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* a nivel *in vitro* a 8 °C, por medio de un modelo de crecimiento.
- Evaluar el efecto de la BAL B2® sobre tres co-cultivos de patógenos a nivel *in vitro* a 8 °C.
- Validar el efecto biopreservante de la BAL B2® sobre *L. monocytogenes* en un producto cárnico cocido terminado almacenado a 8 °C.
- Determinar el efecto de la BAL B2® sobre la microbiota natural y las propiedades fisicoquímicas y sensoriales (pH, textura, proteólisis, color, humedad, nitritos y sinéresis) de un producto cárnico terminado almacenado a 8 °C.

1.4 HIPOTESIS

La BAL B2®, presenta el mismo efecto inhibitor sobre los cuatro patógenos a nivel in vitro y no afecta las propiedades fisicoquímicas de un producto cárnico cocido.

2 MARCO TEÓRICO

El marco teórico, de este trabajo se enfoca en temas relacionados con la biopreservación de productos cárnicos por medio del uso de bacterias ácido lácticas (BAL) y el efecto que tienen estas sobre los microorganismos alterantes como los patógenos, la microbiota natural y las propiedades fisicoquímicas de un producto cárnico cocido.

2.1 BIOPRESERVACIÓN

La biopreservación es un método que busca disminuir la carga microbiana no deseada de un producto, después del proceso de cocción, por medio del uso compuestos antimicrobianos o microorganismos con capacidad antimicrobiana y de esta manera prolongar la vida útil del producto. Entre los principales microorganismos usados en la biopreservación, se encuentran las BAL, las cuales producen una serie de metabolitos antagonicos que inhiben el crecimiento de otras bacterias, entre ellas patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli*, cuya transmisión se da principalmente a través de alimentos contaminados (Holzapfel *et al.*, 1995, Bredholt *et al.*, 1999, 2001, Amezquita and Brashears, 2002, Vermeiren *et al.*, 2004, 2006). Este antagonismo se refiere a la inhibición a través de la competencia por los nutrientes y/o a la producción de uno o más metabolitos con actividad antimicrobiana, como los ácidos orgánicos (láctico y acético), CO₂, peróxido de hidrógeno, enzimas antimicrobianas, bacteriocinas y reuterina (Holzapfel *et al.*, 1995, Bredholt *et al.*, 1999, 2001). De acuerdo a los metabolitos producidos por las BAL, la biopreservación se divide en dos tipos: la biopreservación con bacteriocinas y la biopreservación con cepas no productoras de bacteriocinas.

2.1.1 Biopreservación con bacteriocinas

Las bacteriocinas son un grupo de proteínas o péptidos de bajo peso molecular que se producen en los ribosomas de las bacterias, y tienen la capacidad de interferir en el crecimiento de otras bacterias filogenéticamente relacionadas, a través de la desestabilización de la membrana citoplasmática, por medio de la disipación de la fuerza motriz de protones, se forman poros en la bicapa de fosfolípidos y se causa la lisis celular, evitando así su crecimiento y reproducción, es decir que estas bacteriocinas pueden tener efecto bactericida y bacteriostático (O'Keeffe y Hill, 1999). Entre las bacteriocinas más estudiadas se encuentra la nisina, producida por cepas de *Lactococcus lactis*, la pediocina de cepas de *Pediococcus acidilactici* y la sakacina de cepas de *Lactobacillus sakei*.

La eficacia de las bacteriocinas en los alimentos puede ser limitada por una serie de factores, tales como un bajo espectro de actividad (no activa hacia patógenos Gram-negativas y bacterias de deterioro), la pérdida espontánea de su actividad por inestabilidad genética, difusión limitada en matrices sólidas, la inactivación por enzimas proteolíticas y temperaturas de refrigeración, y la aparición de bacterias resistentes a las bacteriocinas (Holzapfel *et al*, 1995, Rodríguez, *et al*, 2002).

2.1.2 Biopreservación con cepas no productoras de bacteriocinas

Como alternativa para superar las desventajas de las bacteriocinas, se planteó el uso de cepas no productoras de bacteriocinas y muy competitivas, por ejemplo, *Lactobacillus alimentarius* BJ-33 obtenida por (Andersen, 1995, 1997) y *Lactobacillus sakei* TH1 aislado por Bredholt, *et al* (2001), Vermeiren, *et al.*, (2004). Este carácter antagonico se basa en la producción de ácido láctico, causando la acidificación del

medio o alimento y deteniendo el crecimiento de bacterias patógenas (Juven, *et al*, 1998), combinado con la producción de agentes antimicrobianos y la competencia de nutrientes específicos.

A pesar de la efectividad de estas cepas biopreservantes, el empleo de éstas como preservantes naturales, debe ser considerado como una medida adicional a las buenas condiciones de fabricación, procesamiento, almacenamiento y distribución, es decir, su aplicación debe estar basada en el concepto de barrera de crecimiento de microorganismos alterantes, de forma tal, que la calidad del producto a nivel microbiológico no dependa únicamente del biopreservante o antimicrobiano usado. La utilización de biopreservantes en el marco de tecnología de barrera, permite un control total a nivel de inocuidad y calidad en una planta de procesamiento de alimentos. Como parte de estas barreras se pueden usar tratamientos externos (tratamientos térmicos y no térmicos) que están diseñados para ejercer efecto bactericida sobre los microorganismos presentes, es decir inactivar y reducir el número de microorganismos y tratamientos internos que están planteados para inhibir o retardar el crecimiento de microorganismos no deseados, mediante la manipulación de factores intrínsecos tales como pH, actividad de agua, etc. Los agentes antimicrobianos, bacteriocinas y cepas no productoras de bacteriocinas, presentan de forma diferente la inhibición sobre determinados microorganismos; entre los tipos de inhibición que se pueden presentar, se encuentran la reducción del número final de células, retraso de la fase de latencia, inactivación y luego recuperación o la inactivación a niveles indetectables (ver figura 3), entre los cuales se destacan la inactivación y el aumento de la fase de latencia como criterios de selección de compuestos antimicrobianos (David *et al.*, 2013).

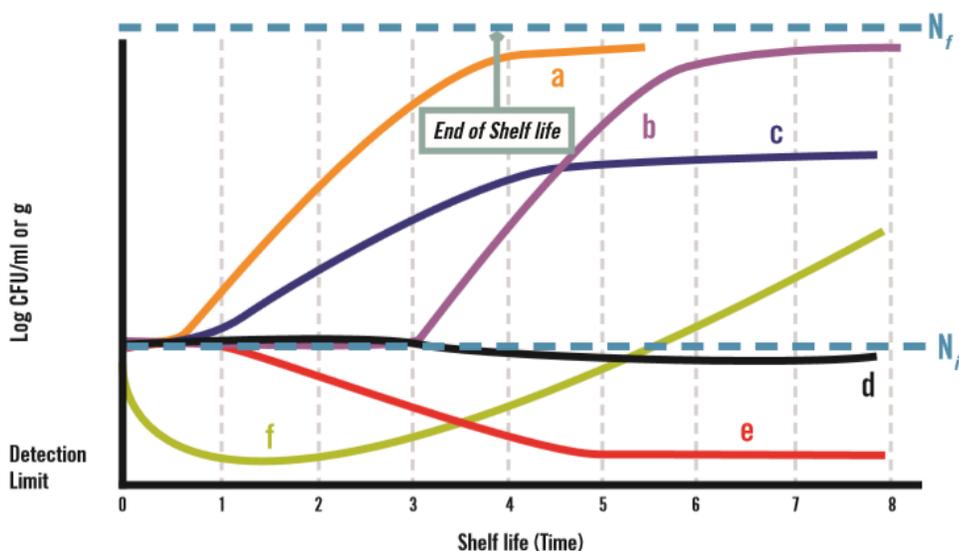


Figura 3. Tipos de inhibición

Donde *a*: control, *b*: Prolongación de la Fase Lag, *c*: Reducción de Velocidad de crecimiento y nivel final, *d*: Crecimiento estático (Inhibición), *e*: Bactericida (inactivación), *f*: Efecto bactericida inicial seguido por crecimiento exponencial, N_i : Número inicial de microorganismos, N_f : Número final de microorganismos⁷ - Tomado de David et al., 2013

2.2 BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS (BAL)

Las bacterias ácido lácticas (BAL) constituyen un grupo diverso de microorganismos ampliamente distribuidos en la naturaleza y son normalmente asociados con los productos lácteos, vegetales y productos cárnicos. Estos microorganismos se caracterizan principalmente por ser bacterias Gram-positivas, catalasa-negativas, no esporuladas, inmóviles, anaerobias o microaerófilas, ácido-tolerantes y productoras de ácido láctico como producto final de la fermentación de carbohidratos. Las BAL requieren de aminoácidos específicos, vitaminas del complejo B y de otros factores de crecimiento para un desarrollo adecuado. Las BAL obtienen su energía de la fermentación de carbohidratos fermentables a ácido láctico como compuesto

⁷ Fuente: David et al., 2013

característico, quedando así su crecimiento limitado a hábitats ricos en azúcares (Sobrino, 1993, Carr *et al.*, 2002, Vermeiren, 2006).

Debido a que el crecimiento de las BAL, está condicionado a medios con alto contenido de azúcares, su clasificación, está ligada a las rutas metabólicas usadas para obtener la energía requerida para su crecimiento. De acuerdo con lo anterior, las BAL se diferencian en dos grupos: homofermentativas que sólo producen ácido láctico a partir de glucosa por la vía de la glicolisis y heterofermentativas que además de ácido láctico producen otros compuestos, como ácido acético y etanol a partir de glucosa por la ruta metabólica de las pentosas (Sobrino, 1993, Carr *et al.*, 2002, Vermeiren, 2006).

Teniendo en cuenta, que uno de los principales productos en los que están presentes las BAL, son los productos cárnicos, es importante indicar que algunas de estas bacterias reducen la concentración de nitritos presentes en estos productos, gracias a un sistema enzimático con actividad nitrito reductasa (Salim Ammor y Mayo, 2007).

2.2.1 *Lactobacillus sakei*

Lactobacillus sakei, hace parte del genero *Lactobacillus*, en el cual las especies son bacilos Gram positivos que varían en forma y tamaño, algunos son muy largos, mientras que otros son cocobacilos, aparecen solos o en cadenas grandes y pequeñas, son anaerobios facultativos y heterofermentativo facultativo. Gracias a esto, *L. sakei* es capaz de degradar las hexosas por la vía de la glucólisis originando 2 moles de ácido láctico como resultado de la fermentación y las pentosas son degradadas por la vía del 6-fosfogluconato en presencia de la enzima fosfoacetolosa dando como resultado cantidades iguales de ácido láctico y acético, pero no originan CO₂, (ver figura 4) (Sobrino, 1993, Carr *et al.*, 2002, Vermeiren, 2006).

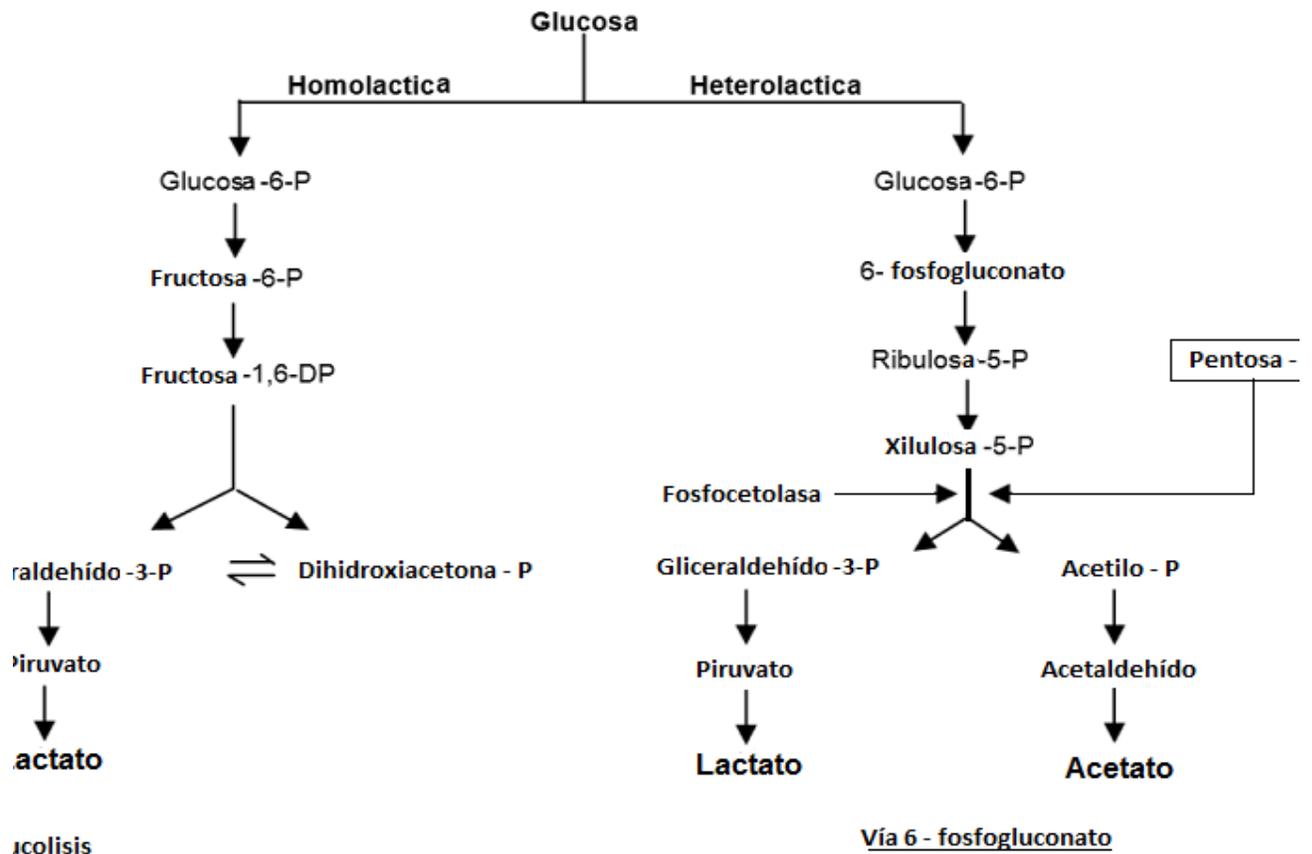


Figura 4. Rutas metabólicas (homoláctica y heteroláctica) – Tomado de: *Sobrino, 1993*

2.3 MICROORGANISMOS PATÓGENOS DE INTERÉS PARA PRODUCTOS CÁRNICOS COCIDOS

Aunque la pasteurización (65-72 °C), en el procesamiento de productos cárnicos cocidos, tiene como objetivo inactivar los microorganismos presentes y desarrollar las características organolépticas del producto, el producto final puede tener carga microbiana no deseada, por contaminación cruzada durante el corte y el envasado (Liu, *et al.*, 2012). Sin embargo, si las temperaturas de almacenamiento previstas se mantienen por debajo de 8 °C, pueden desarrollarse microorganismos psicrótróficos,

como *L. monocytogenes*. Otros patógenos como *Salmonella entérica*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* no crecen a temperaturas bajas, debido al contenido nitritos y otras barreras que no permiten su crecimiento, pero tampoco se inactivan (Devlieghere, 2000, Vermeiren, 2006). En la tabla 1, se relacionan algunas condiciones de crecimiento de los principales patógenos y flora asociada a productos cárnicos cocidos (Steele, R. 2004).

Tabla 1. Condiciones de crecimiento mínimas para patógenos y microorganismos deteriorativos asociados a productos cárnicos cocidos⁸

Tipo de microorganismo		pH mínimo de crecimiento	Aw mínima de crecimiento	T (°C) mínima de crecimiento ^a	Crecimiento anaeróbico
Patógenos	<i>Salmonella</i>	4.0	0.94	7	Si
	<i>Staphylococcus aureus</i>	4.0 (4.5 para la toxina)	0.83 (0.90 para la toxina)	6 (10 para la toxina)	Si
	<i>Listeria monocytogenes</i>	4.3	0.92	0	Si
	<i>Escherichia coli</i>	4.4	0.95	7.0	Si
	<i>E. coli O157:H7</i>	4.5	0.95	-6.5	Si
Microorganismo deteriorativos	Pseudomonas	5.5	0.97	< 0	No
	Bacterias ácido lácticas	3.8	0.94	4	Si
	Levaduras	1-5	0.8	-5	Si
	Mohos	< 2.0	0.6	< 0	No

2.3.1 *Listeria monocytogenes*

Son bacilos flagelados Gram positivos que se pueden presentar solos o en cadenas cortas, móviles, son anaerobios facultativos, aunque la temperatura óptima para su crecimiento está entre 30 y 37°C puede crecer a temperaturas -0,4 °C hasta 45 °C, además de ser altamente tolerante a la sal. Es un patógeno importante, porque tiene la particularidad de crecer en diferentes ambientes; está ampliamente distribuido en la naturaleza por lo que se considera ubicuo y puede ser transmitido por alimentos (FDA,

⁸ Steele, R. 2004.

^a: Las temperaturas mínimas de crecimiento, a pH neutro y alta actividad de agua del alimentos refrigerado

2012, Vermeiren, 2006). Es bien conocido por la formación de biopelículas y una vez que *L. monocytogenes* forma biopelículas en entornos de procesamiento de alimentos, es muy difícil de erradicar el patógeno, por lo tanto, estas biopelículas son la principal amenaza para las empresas procesadoras de alimentos (Hwang y Huang, 2010).

L. monocytogenes prevalece en los alimentos listos para el consumo como verduras, carnes, aves, mariscos, lácteos. Uyttendaele 1999, realizó un estudio sobre la incidencia de *L. monocytogenes* en productos cárnicos listos para el consumo, en el cual encontró una ocurrencia del 13,71 % de 824 carnes crudas curadas, 4,9 % de 3405 carnes cocidas, 21.28 % de 874 ensaladas a base de mayonesa, y el 11,7 % de los 786 platos preparados.

2.3.2 *Escherichia coli*

Son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, móviles o inmóviles, mesófilos, oxidasa negativa, cuyo rango óptimo de temperatura de crecimiento es de 22 a 37°C. Presenta una marcada tolerancia a ambientes adversos incluyendo pH ácidos y bajas concentraciones de humedad. Se ha demostrado también que puede sobrevivir a los procesos de fermentación, secado y almacenamiento a 4°C en salchichas fermentadas con pH por debajo de 4.5 por más de 2 meses (FDA, 2012).

Escherichia coli, se considera parte de la microbiota normal del tracto intestinal de los seres humanos y otros animales de sangre caliente. Generalmente, las cepas de *E. coli* que colonizan el intestino humano son inofensivas, sin embargo, pueden llegar a ser patógenos. *E. coli* O157:H7 es comúnmente asociada con tratamientos de cocción deficientes, alimentos listos para consumir como vegetales, jugos de fruta no pasteurizados, embutidos curados en seco, leche cruda o no pasteurizada y queso semi-curado (Hwang y Huang, 2010).

2.3.3 *Staphylococcus aureus*

Son cocos Gram positivos que se pueden presentar individualmente, en parejas o grupos, no móviles, mesófilos, anaerobios facultativos, productores de toxina y pueden crecer en ambientes de hasta 10% de NaCl. *Staphylococcus aureus* es considerado un patógeno implicado en las enfermedades transmitidas por los alimentos y su hábitat principal es la piel de los seres humanos, animales y aves (FDA, 2012).

S. aureus puede estar presente en el aire, polvo, aguas residuales, leche y otros alimentos. La intoxicación se presenta normalmente por el consumo de alimentos con tratamientos térmicos ineficientes, manipulados o refrigerados a temperaturas mayores de 7 °C. Este microorganismo es resistente a condiciones extremas, pero se inactiva a temperaturas de congelación y procesos de cocción adecuados (>60 °). Los principales síntomas que produce la intoxicación por ingesta de toxinas incluyen diarrea, vómito y dolor abdominal y su intensidad depende de la susceptibilidad del paciente a la toxina, la cantidad de alimento consumido y la cantidad de toxina presente en el alimento (Muntal, 2007).

2.3.4 *Salmonella enteritidis*

Son bacilos Gram negativos y anaerobios facultativos por lo general móviles, mesófilos y no formadores de esporas. Hay más de 2000 serotipos y todos son considerados como patógenos humanos. Se encuentra en el contenido intestinal de los seres humanos, animales, pájaros e insectos y es considerado como una de las principales causas de las enfermedades transmitidas por alimentos, tales como verduras de ensalada, frutos secos, carnes, aves, mariscos, lácteos, pero es más frecuente en los productos listos para el consumo de origen animal, debido a su naturaleza entérica y la capacidad de sobrevivir en condiciones ambientales extremas (Hwang y Huang, 2010, FDA, 2012).

Salmonella puede causar enfermedades como gastroenteritis, fiebre entérica y septicemia; su dosis infectiva puede variar desde menos de un ciclo logarítmico hasta 6 ciclos logarítmicos según el serotipo, alimento, el estado de salud y la edad del paciente. La manifestación de los síntomas puede tardar de 16 – 72 horas y la enfermedad puede durar hasta 7 días (Muntal, 2007).

2.3.5 Microbiota natural de un producto cárnico cocido.

Las bacterias ácido lácticas, son el principal grupo de bacterias que ocasionan deterioro en los productos cárnicos cocidos. Esta contaminación está asociada a la manipulación y contaminación cruzada que se presenta, durante el corte y el envasado que se realizan después del proceso de cocción. Según Samelis *et al.*, 1998; 2000; la concentración de bacterias totales en el producto final está alrededor de 0,5 a 3 log₁₀ (UFC/g) y entre las cuales se pueden encontrar BAL, Enterobacterias, *Brochothrix thermosphacta* y *Listeria spp.*

La reducción del potencial redox en el producto, por el empaque a vacío, inhibe la flora Gram negativa aerobia, constituida básicamente por *Pseudomonas spp.* La presencia de sal y nitritos, generan una reducción de la *A_w*, lo cual favorece el crecimiento de una microbiota anaerobia facultativa Gram positiva, entre las cuales se encuentran principalmente hongos, levaduras y BAL psicrotrofas, como *L. sakei*, *L. curvatus*, *Leuconostoc*, *Weissella* y *Carnobacterium* (Holzaphel *et al.*, 1995; Samelis *et al.*, 2000; Vermeiren, 2006; Ossa *et al.*, 2010). En la tabla 2, se relacionan los requisitos microbiológicos de derivados cárnicos procesados cocidos para salir a la venta, establecidos por el INVIMA, para Colombia.

Tabla 2. Requisitos microbiológicos para derivados cárnicos procesados cocidos⁹

REQUISITO	N	M	M	C
<i>Recuento de microorganismos mesófilos UFC/g</i>	3	200.000	300.000	
<i>Escherichia coli UFC/g</i>	3	< 10		
<i>Recuento de Staphylococcus coagulasa positivo UFC/g</i>	3	<100		
<i>Recuento de esporas de Clostridium sulfito reductor /g</i>	3	100	500	1
<i>Detección de Salmonella spp/25 g</i>	3	Ausencia		
<i>Detección de Listeria monocytogenes/25 g</i>	3	Ausencia		

Dónde: n=Número de muestras que se van a examinar; m=Índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad; M=Índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad y c=Número de muestras permitidas con resultados entre m y M. **Tomado de** NTC 1325

2.4 PRODUCTOS CÁRNICOS COCIDOS

Actualmente, los consumidores exigen alimentos con alto nivel de calidad y esperan que esa calidad se mantenga en este nivel durante el periodo de compra y el consumo. Estas expectativas son una consecuencia no sólo de la exigencia principal que la comida debe seguir siendo segura, sino también de la necesidad de minimizar los cambios no deseados en la calidad sensorial. Por tal razón, es necesario definir el término de vida útil. Steele (2004) define vida útil como “*El período entre la fabricación y venta al por menor de un producto alimenticio, en el que el producto tiene calidad satisfactoria*”, pero el termino *calidad satisfactoria* es muy ambiguo, por tal razón las directrices de IFST (1993), define la vida útil de un producto como: *el tiempo durante el cual el producto alimenticio podrá:*

1. Permanecer seguro.
2. Mantener las características sensoriales, químicas, físicas y microbiológicas deseadas
3. Cumplir con cualquier declaración en la etiqueta de datos nutricionales

Existen varios factores de deterioro, que influyen en la vida útil de un producto y se pueden clasificar como intrínsecos y extrínsecos. Los factores intrínsecos son las

⁹ Tomado de: ICONTEC – NTC 1325, 2008

propiedades del producto final, tales como pH, A_w , microbiota natural, nutrientes, conservantes, etc., los cuales se ven influenciados por variables como el tipo y la calidad de la materia prima, la formulación y la estructura del producto. Los factores extrínsecos, son aquellos que se ven afectados a través de la cadena alimentaria como temperatura, humedad relativa, exposición a la luz durante el procesamiento, distribución y almacenamiento (Samelis, 2000).

Teniendo en cuenta lo anterior, es preciso establecer, las principales características de un producto cárnico cocido. Actualmente, los embutidos cocidos son fabricados a partir emulsiones cárnicas, las cuales presentan generalmente 75,9 % de agua, 16,8 % de proteína, 2,1% de grasa, 4,8 % de cenizas y 3,4 % de sal (NaCl) (Amos *et al.*, 2008). A nivel estructural, esta emulsión está compuesta por una fase continua o dispersante y una fase discontinua o dispersa. Las proteínas de la carne y el agua forman una matriz que encapsula a los glóbulos de grasa, las proteínas solubles de la carne (miofibrilares y sarcoplásmicas) forman la fase continua y la fase dispersante tiene naturaleza lipídica y proteica donde las proteínas asumen el papel de coloide protector (Girard, 1991). Las proteínas cárnicas pueden dividirse en tres categorías en función de sus propiedades de solubilidad: proteínas sarcoplásmicas 30-35%, proteínas miofibrilares 50-55% y proteínas del estroma (proteínas del cito esqueleto y colágeno) 10-20% (González, 2009). Las proteínas solubles de la carne son las miofibrilares y las sarcoplásmicas, mientras que las proteínas del tejido conectivo son muy insolubles (Badui, 1981) y la fracción lipídica muscular está constituida fundamentalmente por triglicéridos y fosfolípidos (Mora Soler, 2010).

Las proteínas juegan un papel importante a nivel sensorial y nutricional. Las principales características de las proteínas solubles son su poder emulsionante, espumantes y su capacidad de absorción de agua, evitando pérdidas de humedad durante el proceso de cocción que se da a una temperatura de 72 °C por 2 horas. El proceso de cocción es fundamental porque tiene cuatro grandes objetivos: la coagulación de las proteínas,

para lo que es necesaria una temperatura de calentamiento en el centro del producto de al menos 72 °C, la inactivación de enzimas, que tiene lugar generalmente entre 60 y 75 °C, el desarrollo de las características organolépticas deseadas y la reducción del número de microorganismos (Mora Soler, 2010). Las propiedades fisicoquímicas de los productos cárnicos emulsionados cocidos, dependen principalmente de los fenómenos que a nivel estructural ejercen las proteínas en la emulsión

Durante la elaboración de los productos cárnicos, los microorganismos están sujetos a un gran número de variables que influyen su desempeño, los factores más importantes son la temperatura, la concentración y tipo de azúcar, la concentración de sal y de nitritos, y el pH (Ray. 2003). Estos factores son aportados por diferentes componentes como nitrito, sal, dextrosa, fosfato, sorbato, eritorbato, leche descremada en polvo, proteínas de soja y diferentes tipos de especias. Estos aditivos hacen parte de una solución llamada salmuera, la cual aporta el sabor y aroma al producto cárnico cocido (Universidad Nacional de Colombia, 2004; Muntal, 2007).

2.5 MODELOS PREDICTIVOS

El crecimiento de las bacterias por lo general sigue una tendencia sigmoideal, que se puede ver afectada por condiciones intrínsecas (propiedades físicas y químicas de un alimento como pH, nivel de sal, y la presencia y concentración de agentes antimicrobianos) y extrínsecos (temperatura y tiempo). En condiciones normales, el crecimiento de bacterias exhibe típicamente tres fases que progresan secuencialmente. La primera es la fase de latencia, durante la cual no se observa ningún cambio aparente en los niveles de las bacterias, la segunda es la fase exponencial, durante la cual el número de bacterias aumenta de forma exponencial y la última es la fase estacionaria, en la que el número de bacterias alcanza la concentración máxima. La duración de la fase de latencia (λ) y la velocidad de crecimiento bacteriano (μ) en la fase exponencial

se ven afectados principalmente por la temperatura y por varias condiciones intrínsecas (Hwang y Huang, 2010).

Autores como Baranyi & Roberts, han desarrollado modelos, que describen el comportamiento de los microorganismos al cambiar algunos factores intrínsecos y extrínsecos. Los modelos primarios, describen la curva de crecimiento dependiente del tiempo bajo condiciones de temperatura constantes, los modelos secundarios describen el efecto de la temperatura y otros factores intrínsecos sobre los parámetros de crecimiento (λ y μ) y un modelo terciario es el modelo matemático que correlaciona los parámetros cinéticos (λ y μ) a ambos factores intrínsecos y extrínsecos, tales como temperatura, pH, concentración de sal, actividad de agua y otros ingredientes.

2.5.1 Modelo Baranyi & Roberts

El modelo Baranyi es probablemente uno de los primeros modelos que intentó describir el mecanismo fundamental que impulsa el crecimiento microbiano. Baranyi & Roberts (1994), plantearon la hipótesis de que el crecimiento de los microorganismos estaba controlado por su estado fisiológico, el cual está afectado por las condiciones previas en las que estaba el microorganismo y la duración de la fase de Lag se ve influenciada por la formación y acumulación de metabolitos secundarios. La ecuación 1, describe el modelo de Baranyi & Roberts (1994).

_____ (1)

Dónde: : Máxima velocidad de crecimiento
 : Concentración de células inicial
 : Tiempo.
 : Estado fisiológico inicial.

2.5.2 Modelo de Gompertz modificado

El modelo de Gompertz modificado hace parte de los modelos empíricos al igual que el modelo logístico, que describen el crecimiento microbiano de un microorganismo en condiciones isotérmicas por medio de la ecuación (2). Las principales críticas de los modelos empíricos son que estos modelos son curvas que se parecen mucho a las curvas de crecimiento microbiano. Aunque estos modelos arrojan los principales parámetros de crecimiento (máxima velocidad de crecimiento y duración de la fase Lag) para describir dos de los fenómenos más importantes del crecimiento microbiano, estos suelen estar sobreestimados (Hwang y Huang, (2010).

(2)

Donde, $L(t)$ es el logaritmo en base 10 de los recuentos de microorganismos en un tiempo dado; $L_{máx}$ es el logaritmo de los recuentos máximos de microorganismos; L_0 es el logaritmo de los recuentos iniciales y $S(t)$ es la función sigmoidea, que se describe a continuación en la ecuación 3.

(3)

Donde M es el punto de inflexión de la curva de crecimiento y μ es la constante relativa en $t = M$, que es el punto de la curva donde se encuentra la máxima velocidad de crecimiento.

3 DISEÑO METODOLÓGICO

La fase experimental de este proyecto se realizó en cuatro etapas:

1. Selección de la cepa biopreservante
2. Estandarización de los inóculos iniciales y medios de cultivo
3. Evaluación del efecto de B2® a nivel *in vitro*
4. Evaluación del efecto de B2® en un producto cárnico cocido.

3.1 SELECCIÓN DE LA CEPA

Para la selección de la cepa, se realizó un estudio preliminar¹⁰ para determinar la capacidad de inhibición de cuatro cepas biopreservantes comerciales sobre los cuatro patógenos de interés, bajo la metodología de halos de inhibición.

Con un asa recta estéril se tomó una alícuota de las cajas con cepas comerciales denominadas 2, 20, 43 y 48 y se sembraron en cajas de agar MRS. Se prepararon cuatro

Erlenmeyer con 100 mL de agar Müller Hilton y se llevaron a 47 °C aproximadamente. Se inoculó cada Erlenmeyer con 1 mL de cultivo activo de los patógenos, se agitó para homogenizar y luego se adicionó una capa de éste sobre las cajas con MRS, luego se incubaron a 25 °C y 8 °C por 24 horas y se midió el diámetro de la zona de inhibición; zona clara en torno a los puntos de inoculación de las cepas B.

3.2 ESTANDARIZACIÓN DE INÓCULOS Y MEDIOS DE CULTIVO

Debido al requerimiento de carbohidratos para el crecimiento de BAL B2®, se buscó un caldo nutritivo adecuado para el crecimiento de los microorganismos estudiados, para lo

¹⁰ Primer Informe de Avance del Proyecto Embutidos Biopreservados 221-2010 de Colciencias

cual se estableció el caldo Brain Heart Infusion (BHI) modificado, como medio para la evaluación de co-cultivos de patógenos con BAL (Antwi *et al.*, 2007, Bredholt *et al.*, 2001, Vermeiren *et al.*, 2004).

Para los cuatro microorganismos patógenos se realizó la primera activación en caldo nutritivo Tryptic Soy Broth (TSB) a 37 °C, temperatura óptima de crecimiento (Alves *et al.*, 2006, Amezquita y Brashears, 2002) y una segunda activación en caldo nutritivo Brain–Heart Infusion BHI modificado a 37 °C.

Para la BAL, se realizó una primera activación en caldo nutritivo Man Rogosa Sharpe (MRS) a 37 °C y la segunda activación en caldo nutritivo (BHI) modificado a 37 °C (Antwi *et al.*, 2007 y 2008, Vereecken *et al.*, 2003).

Los inóculos se estandarizaron posteriormente a la segunda activación, por medio de diluciones seriadas en agua peptonada hasta alcanzar una concentración inicial de 10² UFC/mL para los cuatro patógenos (*L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus* y *S. enteritidis*) y 10⁶ UFC/mL para la bacteria ácido láctica B2®.

Las cepas de los microorganismos patógenos utilizados fueron tomadas del cepario de la Universidad de La Sabana – Facultad de Ingeniería (*L. monocytogenes*–cepa suministrada por la empresa, *E. coli* – ATCC 25922, *S. aureus* - ATCC 25923 y *S. enteritidis* - ATCC 13076) y la cepa B2®, es una cepa comercial de la casa CHr Hansen y sus especificaciones se relacionan en el anexo 8.3.

3.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA BAL A NIVEL *IN VITRO*

La evaluación del efecto de la BAL B2® a nivel *in vitro*, se dividió en dos etapas, en la primera se evaluó el efecto de B2® sobre cada patógeno y en la segunda se evaluó el efecto de B2® sobre co-cultivos de patógenos.

3.3.1 Evaluación del efecto de B2® sobre cada patógeno

Durante la evaluación *in vitro* se determinó el efecto antimicrobiano de la BAL sobre *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*. La evaluación se realizó durante 30 días y los recuentos se hicieron en los días 0, 1, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 18, 20, 22, 25 y 30 para completar 13 puntos de la curva de crecimiento para cada microorganismo a 8 °C. La evaluación sobre *L. monocytogenes* y *S. enteritidis*, se realizó a 100 y 200 ppm de NaNO₂ y para *E. coli* y *S. aureus* se hizo a 100 ppm de NaNO₂. Para cada co-cultivo planteado, se realizaron las curvas de crecimiento de cada microorganismo y la cepa B2 en monocultivo como control.

Los recuentos en placa para cada microorganismo se realizaron en los medios de cultivo específicos para cada uno, luego de su incubación a 37 °C. Los medios de cultivo fueron PALCAM, S&S, Baird Parker, EMB y MRS para *L. monocytogenes*, *S. enteritidis*, *S. aureus*, *E. coli* y la BAL, respectivamente.

3.3.2 Evaluación del efecto de B2® sobre co-cultivos de patógenos

En esta etapa se evaluó el efecto de la cepa biopreservante a nivel *in vitro*, frente a tres co-cultivos y sus controles. La evaluación se realizó durante 30 días a 8 °C y los recuentos se hicieron en los días 0, 1, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 18, 20, 22, 25 y 30 para cada microorganismo. Después de seguir el método de activación y estandarización de los inóculos para cada microorganismo, se inocularon 15 tubos Falcón con 100 µL de cada patógeno y la cepa BAL en 9 mL de caldo BHI modificado (Antwi *et al.*, 2007). Los

recuentos para cada microorganismo se realizaron en los medios de cultivo específicos para cada uno a 37 °C, descritos en el numeral 3.3.1

Los co-cultivos planteados para esta fase del proyecto fueron:

- Co-cultivo 1: B2® + *L. monocytogenes*+ *S. enteritidis*
- Co-cultivo 2: B2® + *L. monocytogenes*+ *E. coli*
- Co-cultivo 3: B2® + *L. monocytogenes*+ *S. aureus*

3.4 ESTIMACIÓN DE LOS PARAMETROS DE CRECIMIENTO

Al finalizar la etapa de experimentación a nivel *in vitro*, se estimaron los parámetros de crecimiento (duración de la fase Lag (λ), velocidad de crecimiento (μ) y concentración máxima de células ($Y_{m\acute{a}x.}$)) para cada microorganismos en los monocultivos y co-cultivos planteados por medio del modelo de Baranyi & Roberts, 1994 y el modelo de Gompertz (Antwi *et al.*, 2007 y 2008, Vereecken *et al.*, 2003).

3.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE B2® EN UN PRODUCTO CÁRNICO COCIDO

La evaluación del efecto de la BAL B2® en un producto cárnico, se dividió en tres etapas:

1. Evaluación del efecto de B2® sobre las propiedades fisicoquímicas del producto
2. Evaluación del efecto de B2® sobre la microbiota natural del producto
3. Evaluación del efecto de B2® sobre *Listeria monocytogenes* inoculada en un producto cárnico cocido.

3.5.1 Evaluación del efecto de la B2® sobre las propiedades fisicoquímicas de un producto cárnico cocido

Para este estudio, se utilizaron paquetes de jamón cocido (220 g) de tres lotes diferentes, producidos por una empresa Colombiana, los cuales fueron usados para tres tratamientos (1-Producto pasteurizado + B2®, 2-Producto pasteurizado y 3-Producto sin pasteurizar) y para cada tratamiento se hicieron tres ensayos independientes. El proceso de pasteurización planteado para los dos primeros tratamientos, se realizó en la Universidad de La Sabana, en un autoclave TOMY SX-700 a 65 °C, por 30 minutos y fue adicional al proceso de cocción que realizó la empresa durante la producción de los lotes de jamón, este proceso de post-pasteurización tuvo como objetivo disminuir la carga microbiana inicial en el producto entregado por la empresa.

Posterior al proceso de post-pasteurización, se preparó una solución al 5% de la cepa biopreservante B2® en agua destilada estéril, como lo indica la casa comercial CHR Hansen (ver anexo 8.3) y el estudio realizado por Hu *et al.*, 2008, a continuación se inocularon 300 µl de la solución de B2® por cada tajada de jamón del tratamiento 1 (Producto pasteurizado + B2®), para una concentración final 10^5 UFC/g de producto y luego los tratamientos fueron empacados a vacío (10 mbar) y almacenados a 8 °C, durante 50 días. La evaluación se realizó en los días 0, 4, 6, 8, 11, 15, 20, 26, 29, 32, 39, 46 y 50 y los parámetros evaluados fueron: pH, nitritos, textura, color y sinéresis; a nivel microbiológico se realizó recuento de mesófilos totales en agar PCA para el tratamiento 2 y 3, y recuento de la cepa B2® para el tratamiento 1 en agar MRS.

El pH y el contenido de nitritos se determinaron siguiendo los métodos 981.12 y 973.31 respectivamente, de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990). El análisis de perfil de textura, se realizó por medio del texturometro Texture Analyser TA.TX2 (Stable Micro Systems) y la probeta P25; los parámetros que se determinaron fueron: dureza, cohesividad, adhesividad y gomosidad (Horita *et al.*, 2011). El análisis

de color, se realizó por medio de un colorímetro Hunter Lab y se determinaron las coordenadas de CIELAB L^* a^* y b^* (Horita *et al.*, 2011).

El grado de proteólisis en el producto, se determinó por el método de electroforesis, descrito por Chaves- López *et al.*, (2011), el cual consistió en extraer las proteínas sarcoplásmicas del producto, para ser evaluadas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y el contenido de proteína del producto se determinó siguiendo el método BCA.

El porcentaje de sinéresis, se determinó siguiendo el método gravimétrico descrito por Vercammen *et al.*, (2011). El cual consistió en colocar las muestras en un ángulo vertical de 45° , y el porcentaje de sinéresis es expresado como el porcentaje de fluidos perdidos, como se muestra en la ecuación (4):

(4)

Dónde: W_{total} : es el peso del empaque con la muestra y los fluidos que hayan perdido.
 $W_{paquete}$: promedio del peso de 50 empaques vacíos
 $W_{muestra}$: peso inicial de la muestra.

3.5.2 Evaluación del efecto de B2® sobre la microbiota natural de un producto cárnico cocido

Para esta etapa, se utilizaron paquetes de jamón cocido (220 g) de tres lotes diferentes producidos por una empresa Colombiana, los cuales fueron usados para dos tratamientos (1: Producto control y 2: Producto + B2®) y para cada tratamiento se hicieron tres ensayos independientes. Se preparó una solución al 5% de la cepa biopreservante B2® en agua destilada estéril, como se indica en el numeral 3.5.1, a continuación se inocularon 300 μ l de la solución de B2® por cada tajada de jamón del

tratamiento 2, para una concentración 10^5 UFC/g de producto. Los dos tratamientos fueron empacados a vacío (10 mbar) y almacenados a 8 °C, durante 30 días. La evaluación se realizó en los días 0, 1, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 18, 20, 22, 25 y 30. Para el tratamiento 1 se realizó recuento de mesófilos totales en agar PCA y para el tratamiento 2 se realizó recuento de B2® en agar MRS + amoxicilina¹¹ y recuento de mesófilos totales en agar PCA.

3.5.3 Evaluación del efecto de B2® sobre *L. monocytogenes* en un producto cárnico cocido

Se utilizaron paquetes de jamón cocido (220 g) de tres lotes diferentes producidos por una empresa Colombiana, los cuales fueron usados para tres tratamientos (1: Producto + B2®, 2: Producto + *L. monocytogenes* y 3: Producto + B2® + *L. monocytogenes*) y para cada tratamiento se hicieron tres ensayos independientes. Se preparó una solución al 5% de la cepa biopreservante B2® en agua destilada estéril, como se indica en el numeral 3.5.1, a continuación se inocularon 300 µl de la solución de B2® por cada tajada de jamón de los tratamientos 1 y 3, para una concentración 10^5 UFC/g de producto y para *L. monocytogenes* se siguió el proceso de estandarización de los inóculos (numeral 3.2) y se inocularon 150 µl por tajada de jamón de los tratamientos 2 y 3, para una concentración final de 10^2 UFC/g de producto. Luego los tres tratamientos fueron empacados a vacío (10 mbar) y almacenados a 8 °C, durante 30 días. La evaluación se realizó en los días 0, 1, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 18, 20, 22, 25 y 30. El recuento de B2® se realizó en agar MRS + amoxicilina y el de *L. monocytogenes* en PALCAM.

¹¹ Resultado del antibiograma realizado específicamente para la cepa B2®

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El tipo de investigación que se realizó para este proyecto fue correlacional, puesto que se busca explicar el fenómeno que ocurre al aplicar la BAL en un producto cárnico cocido. Como resultado de la evaluación se obtuvo la relación que pueda existir entre la BAL con efecto antimicrobiano, sobre cuatro principales patógenos (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli*), y sobre las propiedades fisicoquímicas del producto.

De acuerdo con lo anterior, se determinaron, los parámetros fijos y las variables dependientes e independientes para esta investigación, los cuales se describen a continuación:

1. Parámetros fijos: tipo de producto, temperatura de evaluación (8 °C), la concentración de nitritos y tipo de microorganismos patógenos
2. Variables independientes: tiempo y tipo de microorganismo.
3. Variables dependientes: Parámetros de crecimiento (μ , λ , Y_{Max}) para cada microorganismo y las propiedades fisicoquímicas del producto (pH, nitritos, textura, color, sinéresis y proteólisis).

Para cada tratamiento planteado se realizaron tres ensayos independientes y cada uno por duplicado, tanto para la evaluación a nivel *in vitro* como en producto. Los datos obtenidos en la fase de evaluación del efecto de B2® sobre las propiedades fisicoquímicas del producto, se analizaron utilizando Excel® empleando un ensayo de ANOVA ($p < 0,05$), y se determinó el coeficiente de correlación entre las variables para cada uno de los tratamientos aplicados.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de este proyecto de investigación, obtenidos durante la fase experimental se relacionan a continuación y están divididos en tres etapas (BAL biopreservante seleccionada, efecto de B2® a nivel *in vitro* y efecto de B2® sobre un producto cárnico cocido).

4.1 BAL BIOPRESERVANTE SELECCIONADA

La figura 5 muestra los diámetros de inhibición que presentaron cada una de las cuatro cepas biopreservantes comerciales frente a cuatro patógenos seleccionados (*L. monocytogenes*, *S. enteritidis*, *E. coli* y *S. aureus*) a 25°C. Se observó que las cepas 20 y 48 presentaron una acción selectiva contra *L. monocytogenes* con halos de inhibición de 10mm y 17mm respectivamente; las cepas 2 y 43 mostraron actividad contra los cuatro patógenos con halos de inhibición entre 3mm y 7mm. Estos ensayos se realizaron en condiciones de refrigeración de 8 °C, donde se obtuvieron resultados similares en cuanto a la presencia de zonas de inhibición, sin embargo no fue posible

realizar mediciones precisas de los halos, por el crecimiento disperso que exhibieron los patógenos en lugar de un crecimiento uniforme en el agar. Se seleccionó la cepa biopreservante comercial 2, por su efecto inhibitorio sobre los cuatro patógenos, por su resistencia a la sal y capacidad microaerófila, a diferencia de la cepa biopreservante 43, que también mostró efecto inhibitorio sobre los cuatro patógenos, pero su resistencia a la sal era menor y es aerobia.

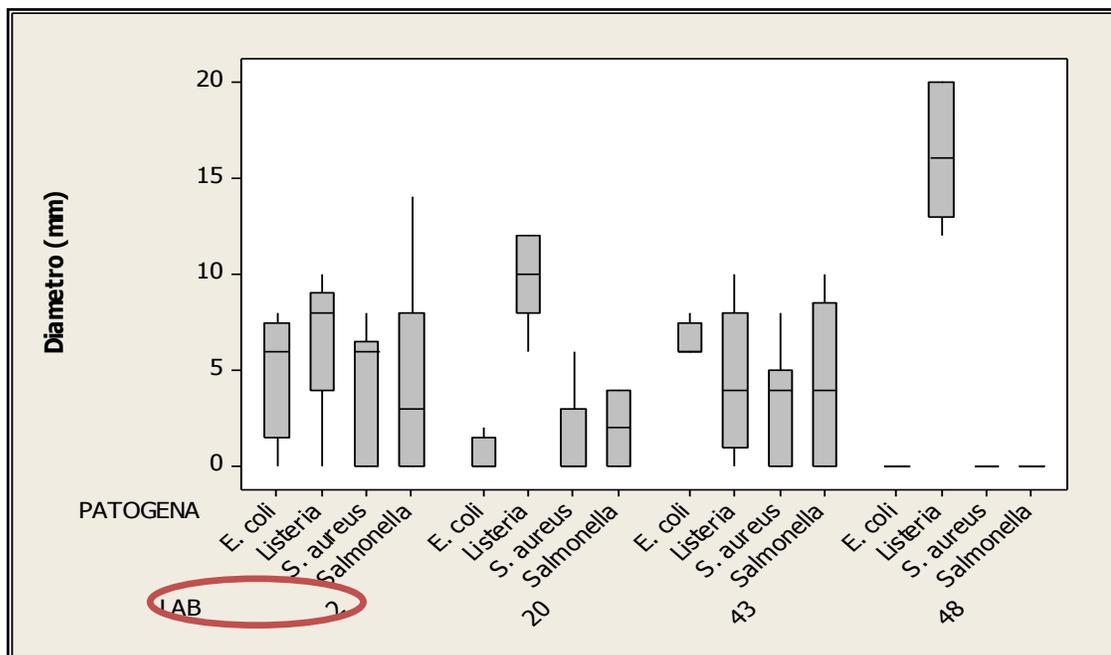


Figura 5. Halos de inhibición de diferentes bioprotectores sobre los cuatro patógenos de interés – Tomado de: Primer Informe de Avances del Proyecto Embutidos Biopreservados 221-2010 de Colciencias

4.2 EFECTO DE B2® A NIVEL *IN VITRO* A 8 °C

Los resultados de esta fase del proyecto, se describen en dos etapas: la primera relaciona el efecto de B2® sobre cada uno de los patógenos evaluados (*L. monocytogenes*, *S. enteritidis*, *E. coli* y *S. aureus*) y la segunda explica el efecto de B2®, sobre los tres co-cultivos planteados.

4.2.1 Efecto de B2® sobre cada patógeno

En las curvas de crecimiento obtenidas (figuras 6, 7, 8, 9 y 10), se observó que la concentración de nitritos no afecta el crecimiento de la cepa B2®, durante los 30 días de evaluación, siendo esta una de las principales características de las BAL aplicadas en productos cárnicos (Salim Ammor y Mayo, 2007). Pruebas preliminares¹², demostraron que una concentración menor a 10^6 UFC/mL de la cepa B2®, no tenía efecto inhibitorio sobre los patógenos estudiados, por tal razón la cepa B2® fue inoculada en una concentración de 10^6 UFC/mL, para todos los experimentos realizados y los patógenos fueron inoculados en una concentración de 10^2 UFC/mL. Vermeiren *et al.*, (2006), indican que la aplicación de *Lactobacillus sakei* 10A en una concentración de 10^6 UFC/g limita el crecimiento de *Listeria monocytogenes* a menos de $1 \log_{10}$ UFC/g durante 24 días a 7 °C, mientras que la aplicación a un nivel de 10^5 UFC/g no alcanzó a prevenir el crecimiento de este patógeno.

El crecimiento de *L. monocytogenes*, se vió afectado por la concentración de nitritos; en co-cultivo con la cepa biopreservante B2® a una concentración de 200 ppm de NaNO_2 , se evidenció que el crecimiento de *L. monocytogenes* se mantiene alrededor de 10^3 UFC/mL durante el tiempo de evaluación, iniciando a 10^3 UFC/mL, mientras que a 100 ppm de NaNO_2 , alcanza la máxima concentración (10^8 UFC/mL) en el día 15, partiendo de una concentración inicial de 10^3 UFC/mL y presenta una fase Lag de 11 días y a 0 ppm de NaNO_2 , alcanza la máxima concentración (10^6 UFC/mL) en el día 13 y presenta una fase Lag de 8 días. Por otra parte, cuando *L. monocytogenes* está en monocultivo no se evidenció fase Lag a 0 y 100 ppm, debido a que el primer seguimiento se realizó a las 24 horas de haber inoculado el patógeno, mientras que a 200 ppm, la fase Lag tuvo una duración de cinco días, como se muestra en la figura 6. A partir de estos resultados, se encontró que la aplicación de la cepa biopreservante B2® en combinación con concentraciones de 200 ppm de nitritos, presentan un efecto sinérgico

¹² Segundo Informe de Avances del Proyecto Embutidos Biopreservados 221-2010 de Colciencias

en el crecimiento estacionario de *L. monocytogenes* a 8 °C. Estudios han demostrado que los nitritos promueven la inhibición de *L. monocytogenes*, en productos listos para el consumo, sin embargo la aplicación de nitritos en los productos cárnicos, no tiene efecto listericida, pero si aumenta su fase Lag (Myers *et al.*, 2013).

El crecimiento de *S. enteritidis* en un medio con una concentración de nitritos de 200 ppm en co-cultivo con B2®, disminuyó de 10^4 a 10^3 UFC/mL, es decir que la cepa B2®, combinada con la aplicación de nitritos a 200 ppm, tuvo efecto bactericida sobre *S. enteritidis* con una reducción de un ciclo logarítmico, mientras que a 100 ppm aumentó en un ciclo logarítmico al día 26 (ver figura 8). Sanz *et al.*, (1997) y González (2002) reportan que la adición nitritos reduce el crecimiento de Enterobacterias como *S. enteritidis*, *E. coli* y bacterias psicrotrofas aproximadamente en dos ciclos logarítmicos, alcanzando niveles menores al nivel del riesgo microbiológico en embutidos madurados.

E. coli y *S. aureus* presentaron inactivación de sus células tanto en monocultivo como en co-cultivo con la cepa B2® sin presentar diferencia significativa ($p < 0.05$) en la inhibición de estos, la reducción fue de 1.71 y 1.64 log UFC/mL para *E. coli* y 0.46 y 0.83 log UFC/mL para *S. aureus* en monocultivo y co-cultivo con B2® respectivamente. La adición de nitritos al medio de cultivo combinado con la temperatura de refrigeración son barreras de crecimiento para estos microorganismos (ver figuras 9 y 10); aunque esta reportado que estos microorganismos patógenos pueden crecer a temperaturas de abuso de refrigeración, es necesario indicar que estos microorganismos crecen a temperaturas desde 7 °C, siempre y cuando se encuentren a pH cercanos a la neutralidad y A_w altas, que son sus condiciones óptimas de crecimiento (Steele, R. 2004).

Al observar las curvas de crecimiento de *S. enteritidis*, *E. coli* y *S. aureus* (figuras 8, 9 y 10), se puede sugerir que la aplicación de nitritos combinado con la temperatura de

refrigeración (8 °C) inhiben el crecimiento de estos microorganismos patógenos, reduciéndolos en un rango de 0.5 a 2 ciclos logarítmicos. Ananou *et al.*, (2010), aplicaron enterocina AS- 48 combinado con conservantes químicos como los nitritos y tratamientos térmicos en jamón cocido sobre *L. monocytogenes* y *S. aureus* a 5 y 15 °C y apreciaron que al aplicar solamente nitritos *L. monocytogenes* presentaba aumento en su crecimiento de tres ciclos logarítmicos y *S. aureus* mantenía su crecimiento estable durante el tiempo de evaluación, pero al combinar la aplicación de la enterocina AS- 48 con los nitritos, los dos microorganismos presentaron inhibición a 5 °C.

En el estudio realizado por Alba *et al.*, (2013), estimaron el efecto de la aplicación de altas presiones (HP) a 8 °C, sobre *E. coli* O157:H7 y encontraron que este patógeno tuvo crecimiento estacionario en el control a 8 °C; este mismo fenómeno lo observaron Jofré *et al.*, (2008), quienes evaluaron el efecto de la aplicación de altas presiones hidrostáticas (HPP), combinado con la aplicación de agentes antimicrobianos a 6 °C, sobre *Salmonella* sp. *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* en jamón cocido y observaron que *Salmonella* sp y *S. aureus* tuvieron un crecimiento estacionario en los controles a 6 °C.

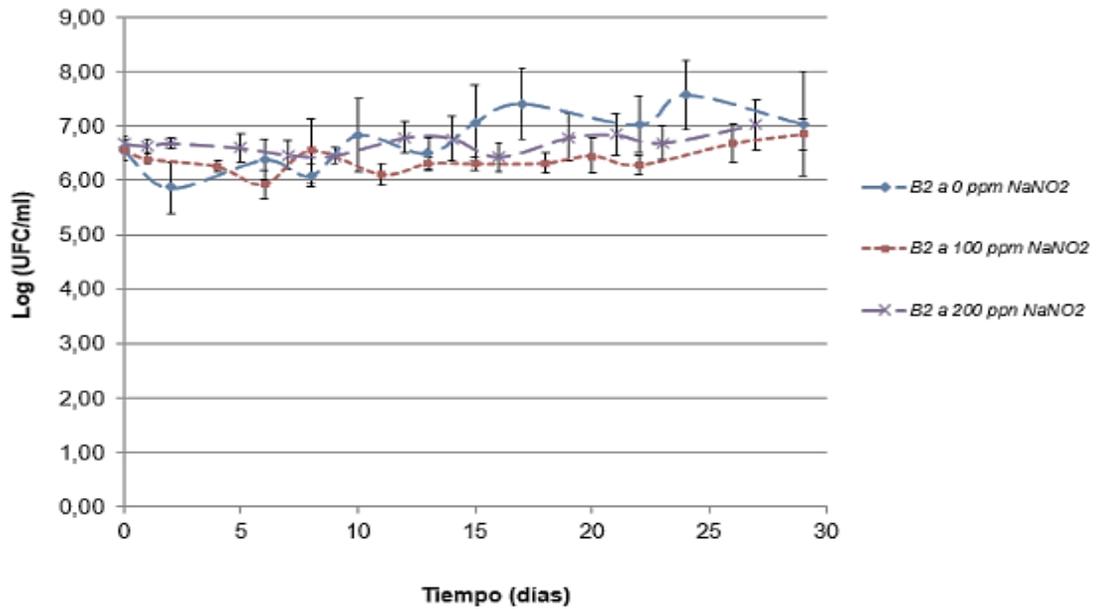


Figura 6. Curva de crecimiento de B2 en monocultivo a tres concentraciones de nitritos

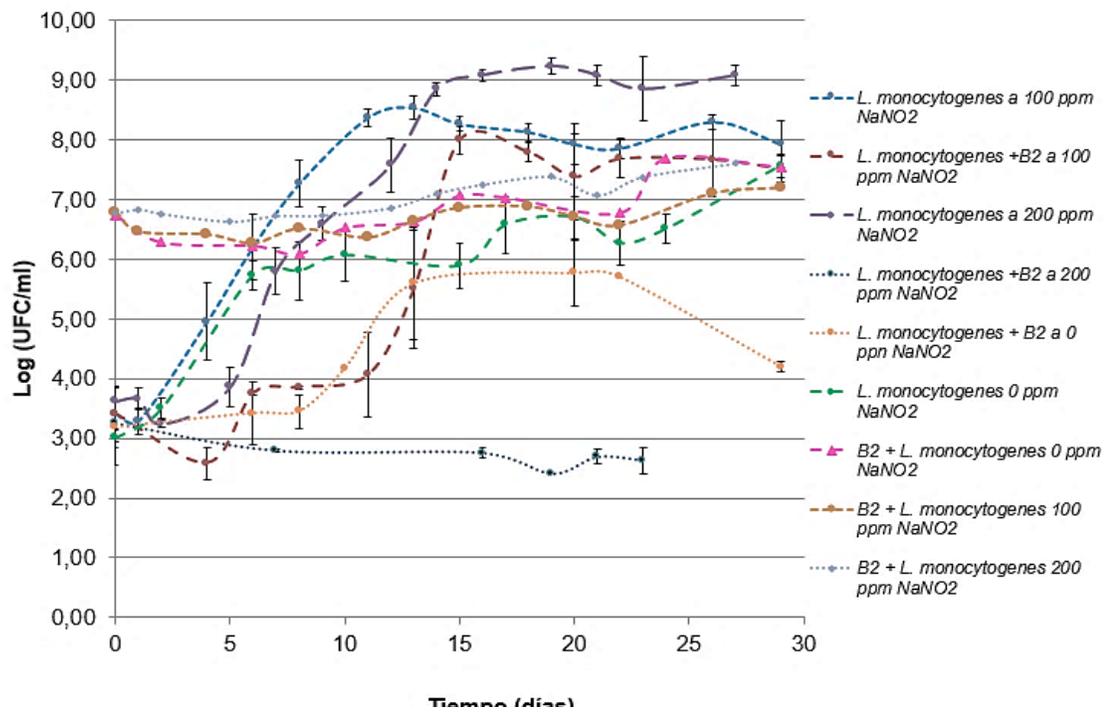


Figura 7. Curva de crecimiento de *L. monocytogenes* en monocultivo y cocultivo con B2® a tres concentraciones de nitritos

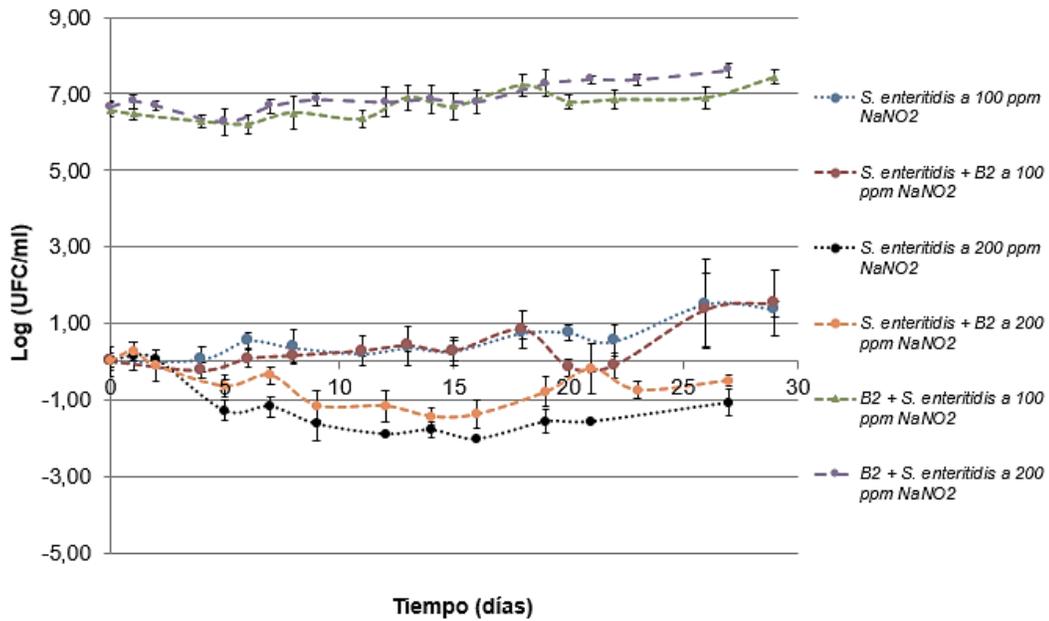


Figura 8. Curva de crecimiento de *S. enteritidis* en monocultivo y cocultivo con B2® a dos concentraciones de nitritos

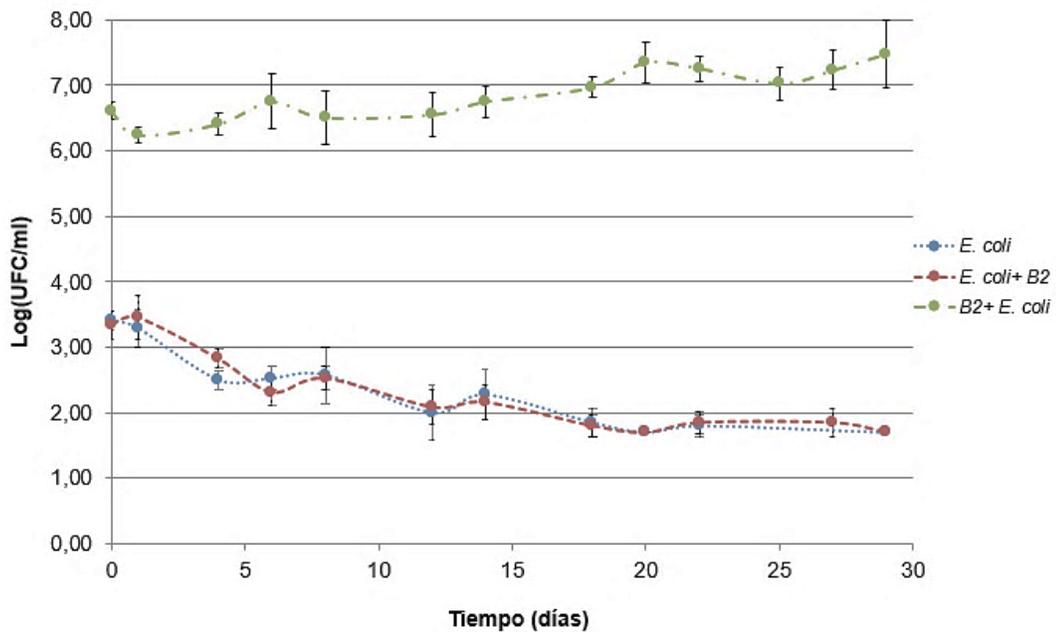


Figura 9. Curva de crecimiento de *E. coli* en monocultivo y cocultivo con B2® a 100 ppm de nitritos

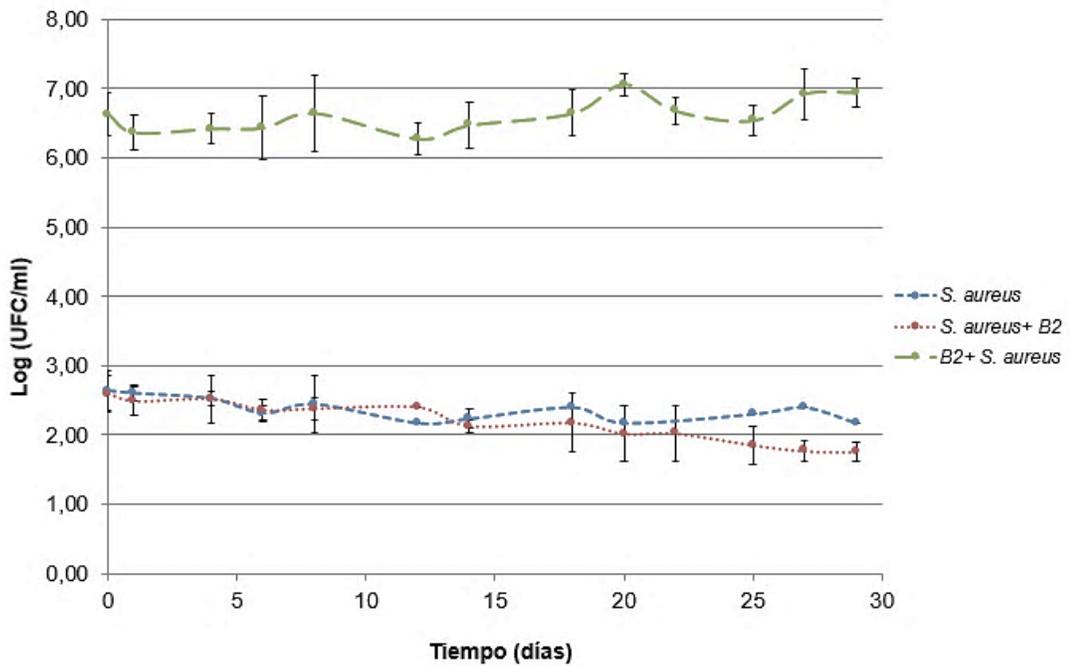


Figura 10. Curva de crecimiento de *S. aureus* en monocultivo y cocultivo con B2® a 100 ppm de nitritos

4.2.1.1 Parámetros de crecimiento de cada patógeno en monocultivo y en cocultivo con B2®

A partir de las curvas de crecimiento obtenidas, se determinaron los las velocidades de crecimiento (μ), el tiempo de duración de la fase de latencia (λ) y la concentración inicial y final (Y_0 y $Y_{m\acute{a}x.}$) para cada microorganismo, las cuales fueron calculadas por medio del modelo de Baranyi & Roberts, 1994 y el modelo de Gompertz.

Tabla 3. Parámetros de crecimiento para los cuatro patógenos evaluados en monocultivo y co-cultivo con la cepa B2® obtenidos por el modelo de Baranyi & Roberts y el modelo de Gompertz

CURVA		RATE (μ)	FASE LAG (λ)	Y_0	$Y_{M\acute{A}X.}$	SE(Fit)	R ² _stat
MODELO BARANYI & ROBERTS	B2 - 0 ppm	0,049		6,145		0,588	0,328**
	B2 - 100 ppm	0,079	21,959	6,312		0,185	0,403**
	B2 - 200 ppm	0,010		6,558		0,152	0,217**

	<i>B2 + L. monocytogenes- 0 ppm</i>	0,050		6,267		0,691	0,186**
	<i>B2 + L. monocytogenes- 100 ppm</i>	0,021		6,390		0,213	0,438**
	<i>B2 + L. monocytogenes- 200 ppm</i>	0,043	7,318	6,727		0,127	0,831
	<i>B2 + S. enteritidis - 100 ppm</i>	0,030		6,301		0,233	0,586**
	<i>B2 + S. enteritidis - 200 ppm</i>	0,064	11,023	6,638		0,161	0,815
	<i>B2 + E. coli - 100 ppm</i>	0,035		6,356		0,181	0,787
	<i>B2 + S. aureus - 100 ppm</i>	0,015		6,405		0,190	0,352**
	<i>L. monocytogenes – 0 ppm</i>	0,397		2,889	5,987	0,198	0,970
	<i>L. monocytogenes- 100 ppm</i>	0,532		3,040	8,171	0,272	0,979
	<i>L. monocytogenes- 200 ppm</i>	0,539	3,426	3,393	9,090	0,327	0,982
	<i>L. monocytogenes+ B2 - 0 ppm</i>	0,537	8,388	3,312	5,737	0,098	0,993
	<i>L. monocytogenes+ B2 - 100 ppm</i>	1,265	11,216	3,446	7,671	0,427	0,959
	<i>L. monocytogenes+ B2 - 200 ppm</i>	-0,027		3,138		0,171	0,636**
	<i>S. enteritidis - 100 ppm</i>	0,045		2,307		0,253	0,715**
	<i>S. enteritidis - 200 ppm</i>	-0,237		4,432	2,545	0,312	0,842
	<i>S. enteritidis + B2 - 100 ppm</i>	0,229	22,251	2,913		0,356	0,625**
	<i>S. enteritidis + B2 - 200 ppm</i>	-0,122		4,187	3,126	0,401	0,461**
	<i>E. coli - 100 ppm</i>	-0,091		3,227	1,755	0,203	0,886
	<i>E. coli + B2 - 100 ppm</i>	-0,106		3,324	1,794	0,178	0,917
	<i>S. aureus - 100 ppm</i>	-0,036		2,637	2,271	0,096	0,657**
	<i>S. aureus + B2 - 100 ppm</i>	-0,028		2,590		0,070	0,942
MODELO GOMPERTZ	<i>B2 – 0 ppm</i>	0,049		6,145		0,588	0,328**
	<i>B2 - 100 ppm</i>	0,197	24,076	6,318	6,861	0,194	0,348**
	<i>B2 - 200 ppm</i>	62,814	101,747	6,608	9742,008	0,145	0,287**
	<i>B2 + L. monocytogenes- 0 ppm</i>	1,968	8,318	6,215	7,282	0,651	0,276**
	<i>B2 + L. monocytogenes- 100 ppm</i>	0,069	19,374	6,486	10,256	0,205	0,481**
	<i>B2 + L. monocytogenes- 200 ppm</i>	0,059	8,935	6,742	7,502	0,130	0,822

<i>B2 + S. enteritidis - 100 ppm</i>	0,053	8,069	6,392	7,196	0,239	0,563**
<i>B2 + S. enteritidis - 200 ppm</i>	0,068	11,336	6,646	7,982	0,167	0,800
<i>B2 + E. coli - 100 ppm</i>	0,099	11,739	6,505	7,296	0,178	0,792
<i>B2 + S. aureus - 100 ppm</i>	1,493	17,877	6,467	6,828	0,178	0,428**
<i>L. monocytogenes – 0 ppm</i>	0,568	1,243	3,003	5,998	0,203	0,968
<i>L. monocytogenes- 100 ppm</i>	0,847	2,271	3,346	8,180	0,276	0,979
<i>L. monocytogenes- 200 ppm</i>	0,692	4,251	3,480	9,147	0,318	0,983
<i>L. monocytogenes+ B2 - 0 ppm</i>	0,825	8,993	3,352	5,738	0,119	0,990
<i>L. monocytogenes+ B2 - 100 ppm</i>	14,110	12,860	3,528	7,673	0,445	0,955
<i>L. monocytogenes+ B2 - 200 ppm</i>	-0,076	0,000	3,304	2,610	0,189	0,559**
<i>S. enteritidis - 100 ppm</i>	9,403	118,512	2,431	2299,959	0,237	0,751**
<i>S. enteritidis - 200 ppm</i>	-0,457	2,080	4,287	2,568	0,295	0,858
<i>S. enteritidis + B2 - 100 ppm</i>	0,670	23,682	2,907	4,283	0,337	0,663**
<i>S. enteritidis + B2 - 200 ppm</i>	-0,197	1,512	4,137	3,140	0,424	0,396**
<i>E. coli - 100 ppm</i>	-0,127	0,000	3,379	1,758	0,214	0,874
<i>E. coli + B2 - 100 ppm</i>	-0,151	0,000	3,496	1,796	0,169	0,925
<i>S. aureus - 100 ppm</i>	-0,056	1,759	2,627	2,274	0,102	0,606**
<i>S. aureus + B2 - 100 ppm</i>	-0,037	3,347	2,682	-0,293	0,069	0,942

** A las condiciones evaluadas, estas curvas de crecimiento no se ajustan al modelo de Baranyi & Roberts ni al modelo de Gompertz.

En la tabla anterior, se relacionan los parámetros de crecimiento obtenidos para los cuatro microorganismos evaluados (*L. monocytogenes*, *S. enteritidis*, *E. coli* y *S. aureus*), tanto en monocultivo como en co-cultivo con la cepa biopreservante B2®, determinados por el modelo de Baranyi & Roberts y el modelo de Gompertz. Al comparar los parámetros de crecimiento obtenidos por los dos modelos, se determinó que el modelo de Baranyi & Roberts presenta mejor ajuste a los datos experimentales que el modelo de Gompertz, puesto que este último sobreestima en algunos casos los

parámetros de crecimiento (ver datos subrayados en rojo en la tabla 3). Por otra parte, Las curvas de crecimiento de B2® y *S. enteritidis* presentaron crecimiento estacionario y *E. coli* y *S. aureus* presentaron inactivación, razón por la cual tienen coeficientes de correlación (R^2) bajos, según Hwang y Huang, (2010), para estimar el crecimiento microbiano, por medio de un modelo, las curvas deben presentar crecimiento sigmoideal, y el modelo debe ser capaz de describir las tres fases de crecimiento claramente, lo que indica que para el caso de B2®, *S. enteritidis*, *E. coli* y *S. aureus* ni el modelo de Baranyi & Roberts ni el modelo de Gompertz son idóneos para determinar los parámetros de crecimiento.

Para el caso de B2®, tal como se anotó en la tabla, el crecimiento de esta BAL no se ajustó al modelo de Baranyi & Roberts ni al modelo de Gompertz, ya que para esta investigación el medio de cultivo utilizado fue BHI modificado, con el fin evaluar el crecimiento de la cepa B2® en co-cultivo con los patógenos; investigadores como Slongo *et al.*, (2009), quienes determinaron el efecto de altas presiones hidrostáticas en el crecimiento de BAL en caldo nutritivo MRS, encontraron que el crecimiento de BAL se ajustaban al modelo de Gompertz, lo que indica que el medio de cultivo influye en el crecimiento de la cepa B2®, por otra parte al comparar el crecimiento de la cepa B2® a nivel *in vitro* con el crecimiento en producto, se evidencio que en un medio anaeróbico la cepa biopreservante presenta un aumento en su tasa de crecimiento y esto concuerda con la ficha técnica de la cepa (anexo 8.3), en la que indican que esta es anaerobia.

El comportamiento de *L. monocytogenes* fue evaluado a tres concentraciones nitritos (0, 100 y 200 ppm), tanto en monocultivo como en co-cultivo con B2® y como resultado se obtuvieron los parámetros de crecimiento de este patógeno a las diferentes condiciones. A partir de estos resultados, se determinó que la BAL B2® en combinación con la aplicación de nitritos, tienen un efecto sinérgico en el crecimiento estacionario de *L. monocytogenes*, puesto que en co-cultivo con B2® y 200 ppm de NaNO_2 , este

microorganismo presentó una velocidad de crecimiento negativa (-0.027 log UFC/día) y a 100 ppm de NaNO₂, tuvo una velocidad de crecimiento de 1.265 log UFC/día y una fase Lag de 11 días. A diferencia de los co-cultivos con B2®, el control de *L. monocytogenes* registró una velocidad de crecimiento de 0.539 log UFC/día y una fase Lag de 3 días a 200 ppm de NaNO₂, mientras que a 100 ppm presentó una velocidad de crecimiento de 0.532 log UFC/día.

Se realizó una búsqueda en la base de datos de Combase, para comparar los parámetros de crecimiento obtenidos para *L. monocytogenes* a 100 y 200 ppm de NaNO₂ y 8 °C, con los reportados en la base de datos y se observó que la fase Lag tuvo una duración de 8.96 horas y 10.48 horas para 100 y 200 ppm de NaNO₂, respectivamente y la velocidad de crecimiento presento valores de 0.034 y 0.029 log UFC/h, lo que concuerda con lo reportado por Myers *et al.*, (2013), quienes indican que la adición de nitritos prolonga la fase Lag de microorganismos patógenos como *L. monocytogenes*, pero no tiene efecto listericida.

De acuerdo con los resultados obtenidos para los patógenos, se determinó que la fase de latencia de *L. monocytogenes*, se ve prolongada en 11 días por la aplicación de B2® combinado con la adición de nitritos en 100 ppm y en 8 días a 0 ppm de NaNO₂. Por otra parte, la temperatura y los nitritos, ejercen un efecto barrera en el crecimiento de *S. enteritidis*, *E. coli* y *S. aureus*, causando que *S. enteritidis* a 100 ppm de NaNO₂ tenga un crecimiento estacionario y *E. coli* y *S. aureus* presenten inactivación de sus células (Jofré *et al.*, 2008; Ananou *et al.*, 2010; Alba *et al.*, 2013).

4.2.2 Efecto de B2® sobre co-cultivos de patógenos a 8 °C

Las curvas de crecimiento obtenidas para *S. enteritidis*, *E. coli* y *S. aureus* permitieron determinar que debido a la temperatura de evaluación (8 °C), el contenido de nitritos de

100 ppm NaNO₂ no presentaron aumento en su velocidad de crecimiento en los co-cultivos realizados. Steele (2004) y Mellefont *et al.*, (2008), reportan que una de las causas de la inactivación de *S. enteritidis*, *E. coli* y *S. aureus* es el agotamiento de los nutrientes en co-cultivo con *L. monocytogenes* y B2®

En la figura 11, se presentan las curvas de crecimiento para el cocultivo 1 (B2® + *L. monocytogenes*+ *S. enteritidis*), a partir de las cuales se determinó que *S. enteritidis* en monocultivo aumentó 1,38 log UFC/mL con respecto a la concentración inicial, pero en co-cultivo con B2® y *L. monocytogenes* presentó un crecimiento estacionario, en el cual su nivel final fue igual al inicial (2,39 log UFC/mL)

E. coli y *S. aureus* disminuyeron su velocidad de crecimiento hasta ser completamente inactivados en el día 18, en co-cultivo *L. monocytogenes* y B2® (Figuras 12 y 13). Un comportamiento similar presentaron estos dos patógenos en monocultivo, donde *S. aureus* presentó una reducción menor a un ciclo logaritmico y *E. coli* tuvo una reducción de 1.71 log UFC/mL con respecto a su nivel inicial (3.22 log UFC/mL) al día 30.

A pesar del comportamiento que presentaron estos patógenos *L. monocytogenes*, presentó aumento en su concentración máxima (Y máx) y un aumento de la fase Lag de 11 días para los co-cultivos 1 y 2 y de 6 días para el co-cultivo 3 con respecto al control, como se presenta en las figuras 11, 12 y 13.

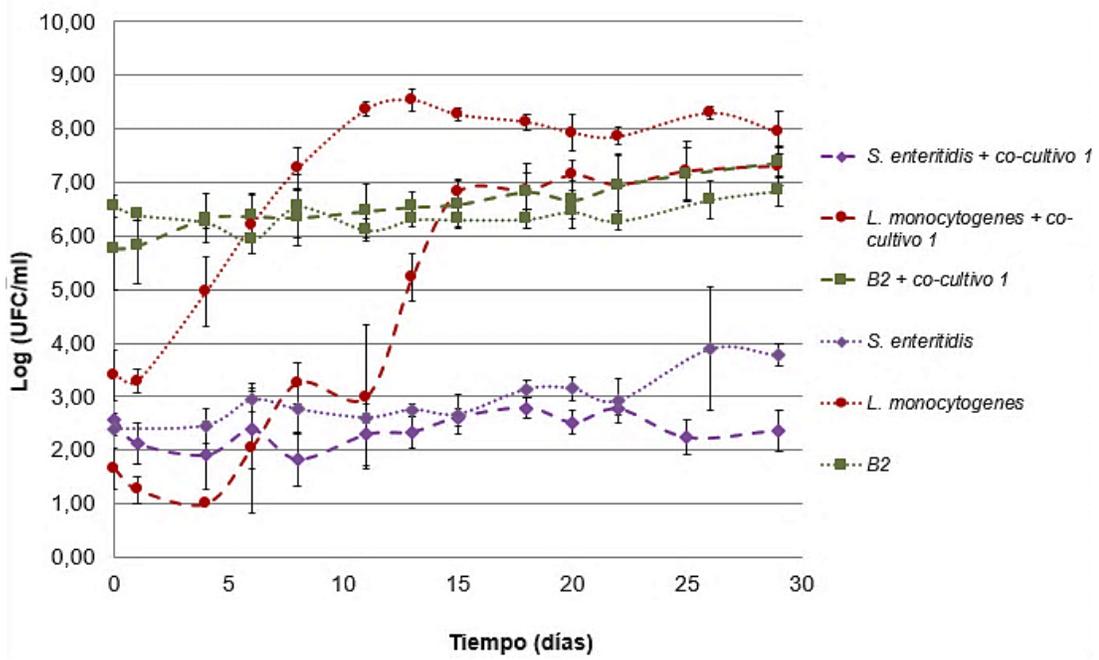


Figura 11. Curvas de crecimiento para el co-cultivo 1 a 100 ppm de nitritos

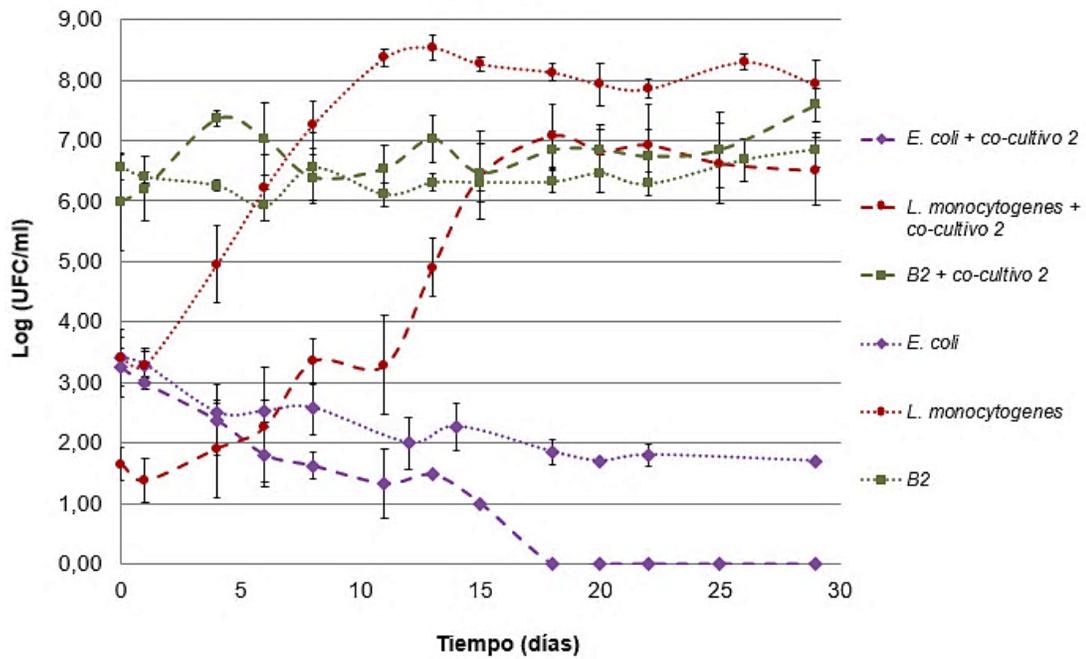


Figura 12. Curvas de crecimiento para el co-cultivo 2 a 100 ppm de nitritos

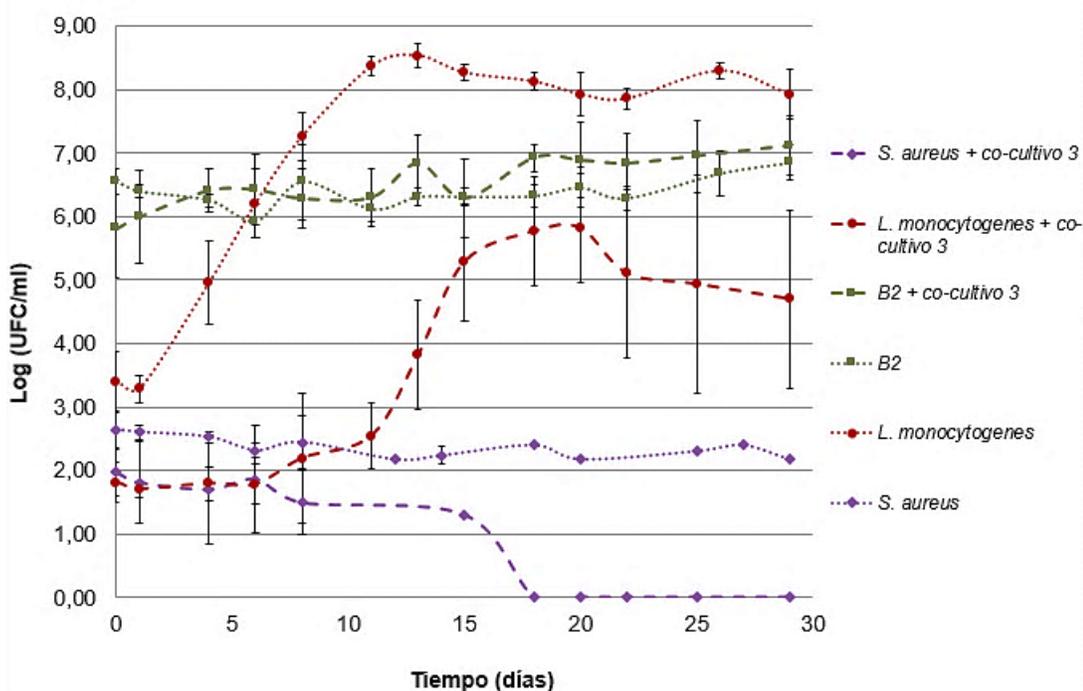


Figura 13. Curvas de crecimiento para el co-cultivo 3 a 100 ppm de nitritos

4.2.2.1 Parámetros de crecimiento para los tres co-cultivos de patógenos

La evaluación *in vitro* generó como resultados las velocidades de crecimiento (μ), el tiempo de duración de la fase de latencia (λ) y la concentración inicial y final (Y_0 y $Y_{\text{máx.}}$) para cada microorganismo, las cuales fueron calculadas por medio del modelo de Baranyi & Roberts, 1994 y el modelo de Gompertz.

Tabla 4. Parámetros de crecimiento para los tres co-cultivo y los respectivos controles obtenidos por el modelo de Baranyi & Roberts

CURVA		RATE (μ)	LAG (λ)	Y0	Y máx.	SE (FIT)	R ² _STAT
MODELO DE BARANYI & ROBERTS	B2®	0,079	21,959	6,312		0,185	0,403**
	B2® + Co-cultivo 1	0,048		5,915		0,126	0,926
	B2® + Co-cultivo 2	0,026		6,421		0,397	0,214**
	B2® + Co-cultivo 3	0,039		6,027		0,191	0,778**
	<i>L. monocytogenes</i>	0,532		3,04	8,171	0,272	0,979

	<i>L. monocytogenes</i> + Co-cultivo 1	0,577	6,327	1,381	7,139	0,537	0,957
	<i>L. monocytogenes</i> + Co-cultivo 2	0,53	6,687	1,747	6,808	0,444	0,962
	<i>L. monocytogenes</i> + Co-cultivo 3	0,79	10,385	1,86	5,287	0,364	0,954
	<i>S. enteritidis</i>	0,045		2,307		0,253	0,715**
	<i>S. enteritidis</i> + Co-cultivo 1	0,013		2,199		0,278	0,083**
	<i>E. coli</i>	-0,091		3,227	1,755	0,203	0,886
	<i>E. coli</i> + Co-cultivo 2	-0,217		3,222	1,264	0,168	0,957
	<i>S. aureus</i>	-0,036		2,637	2,271	0,096	0,657**
	<i>S. aureus</i> + Co-cultivo 3	-0,042		1,924		0,118	0,780**
MODELO DE GOMPERTZ	B2®	0,197	24,076	6,318	6,861	0,194	0,348**
	B2® + Co-cultivo 1	0,061	0,000	5,591	11,730	0,154	0,889
	B2® + Co-cultivo 2	0,040	0,000	5,875	14,478	0,437	0,044**
	B2® + Co-cultivo 3	0,048	0,000	5,945	7,262	0,216	0,717**
	<i>L. monocytogenes</i>	0,847	2,271	3,346	8,180	0,276	0,979
	<i>L. monocytogenes</i> + Co-cultivo 1	0,567	6,061	1,407	7,462	0,590	0,948
	<i>L. monocytogenes</i> + Co-cultivo 2	0,517	6,063	1,723	7,017	0,546	0,943
	<i>L. monocytogenes</i> + Co-cultivo 3	0,932	10,500	1,870	5,300	0,395	0,945
	<i>S. enteritidis</i>	9,403	118,512	2,431	2299,959	0,237	0,751**
	<i>S. enteritidis</i> + Co-cultivo 1	0,101	10,182	2,167	2,543	0,263	0,183**
	<i>E. coli</i>	-0,127	0,000	3,379	1,758	0,214	0,874
	<i>E. coli</i> + Co-cultivo 2	-0,252	0,000	3,346	1,149	0,167	0,957
	<i>S. aureus</i>	-0,056	1,759	2,627	2,274	0,102	0,606**
	<i>S. aureus</i> + Co-cultivo 3	-0,048	0,000	1,973	0,966	0,166	0,561**

** A las condiciones evaluadas, estas curvas de crecimiento no se ajustan al modelo de Baranyi & Roberts ni al modelo de Gompertz.

En la tabla 4, se relacionan los parámetros de crecimiento obtenidos para cada uno de los microorganismos evaluados tanto en monocultivo como en co-cultivo. El primer co-cultivo planteado corresponde a (B2® + *L. monocytogenes*+ *S. enteritidis*), en el cual *S. enteritidis* presentó una velocidad de crecimiento positiva de 0.013 log UFC/día, la cual fue menor a la velocidad de crecimiento de este patógeno en monocultivo (0.045 log UFC/ día), que podría deberse al efecto de B2® y de *L. monocytogenes*.

Las velocidades de crecimiento para *L. monocytogenes*, en co-cultivo con *S. enteritidis*, *E. coli* y *S. aureus* fueron de 0.577, 0.5303 y 0.7896 log UFC/día respectivamente. La duración de la fase de latencia, fue de 6.3, 6.7 y 10.3 días y el nivel máximo (Y máx.), fue de 7.14, 6.80 y 5.29 log UFC/mL respectivamente. Sin embargo, la mayor concentración de *L. monocytogenes* se presentó en monocultivo con un valor de 8.17 log UFC/mL, una velocidad de crecimiento de 0.5320 log UFC/día y una fase de latencia de 3 días. Lo que indica que la presencia de B2® y los demás patógenos estudiados prolongan la fase Lag de *L. monocytogenes*, debido a la competencia por los nutrientes entre los microorganismos presentes en cada uno de los co-cultivos.

La cepa B2®, presentó velocidades de crecimiento de 0.048, 0.0255 y 0.0391 log UFC/día para los co-cultivos 1, 2 y 3 respectivamente y la curva control de B2®, tuvo una velocidad de crecimiento de 0.0790 log UFC/día, debido a que no hay competencia por los nutrientes con los demás microorganismos estudiados, como ocurre en los co-cultivos. Al igual que en la evaluación sobre cada patógeno, algunas curvas de crecimiento de B2®, presentaron coeficientes de correlación (R^2) bajos, lo que se pudo deber a la influencia del medio de cultivo en el crecimiento de la cepa B2® y al medio aerobio en el que se realizó la evaluación (Slongo *et al.*, 2009).

De acuerdo con los resultados obtenidos para los patógenos, se determinó que la fase de latencia de *L. monocytogenes*, se ve prolongada en co-cultivo con los otros patógenos y B2® y que la reducción en el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus*, es mayor cuando se encuentra en co-cultivo con *L. monocytogenes* y B2®. Al comparar la velocidad de crecimiento de *L. monocytogenes*, ésta es mayor cuando se encuentra en co-cultivo con los patógenos, fenómeno que se puede deber principalmente a la competencia de nutrientes, esto también ha sido explicado por Mellefont *et al.*, (2008), quienes indican que el crecimiento de *L. monocytogenes* se estimula y el de *E. coli* y *S. aureus* decae rápidamente por la temperatura de refrigeración y el agotamiento de los nutrientes.

Puesto que las curvas de crecimiento de B2® presentaron crecimiento estacionario y las curvas de *S. enteritidis*, *E. coli* y *S. aureus* presentaron inactivación, tienen coeficientes de correlación (R^2) bajos, según Hwang y Huang, (2010), para estimar el crecimiento microbiano, por medio de un modelo, las curvas deben presentar crecimiento sigmoideal, y el modelo debe ser capaz de describir las tres fases de crecimiento, lo que indica que los dos modelos evaluados no son los idóneos para calcular los parámetros de crecimiento. Al comparar los parámetros de crecimiento obtenidos por los dos modelos, se determinó que el modelo de Baranyi & Roberts presenta mejor ajuste a los datos experimentales que el modelo de Gompertz, puesto que este último sobreestima en algunos casos los parámetros de crecimiento (ver datos subrayados en rojo en la tabla 4).

4.3 EFECTO DE B2® EN UN PRODUCTO CÁRNICO COCIDO

A continuación se describen los resultados obtenidos del efecto de B2®, sobre las propiedades fisicoquímicas, la microbiota natural y *L. monocytogenes* inoculada en el producto.

4.3.1 Comportamiento de B2® en un producto cárnico cocido.

Teniendo en cuenta que la microbiota natural de un producto cárnico cocido está compuesta básicamente por BAL, hongos y levaduras (Holzapfel *et al.*, 1995; Samelis *et al.*, 2000; Vermeiren, 2006; Ossa *et al.*, 2010), se aplicó un proceso de post-pasteurización, con el fin de disminuir la carga microbiana inicial de mesófilos totales del producto, la cual fue de (10^2 UFC/g) para los tratamientos 2 y 3 (producto pasteurizado y producto sin pasteurizar respectivamente), como se muestra en la figura 14 y se determinó que el proceso de pos-pasteurización (30 minutos a 65 °C), no fue efectivo para disminuir la carga inicial del producto. A pesar de que el tratamiento térmico no fue

efectivo, era necesario tener un control del producto tratado térmicamente, para verificar el efecto de este sobre las propiedades fisicoquímicas.

Por otra parte B2®, aumentó su velocidad de crecimiento significativamente comparado con el comportamiento que presentó a nivel *in vitro* con valores de 0.079 y 0.304 log UFC/día para la evaluación a nivel *in vitro* y en producto respectivamente. El aumento en la velocidad de crecimiento de B2® durante la evaluación en producto generó un descenso del pH, básicamente por la producción de ácido láctico por parte de B2®, como indica la ficha técnica de esta cepa biopreservante (ver anexo 8.3.) y como lo indica el estudio realizado por Alves *et al.*, (2006), en el cual determinaron que la inhibición de *L. monocytogenes* se debió a la producción de ácido láctico por parte de *L. sakei*.

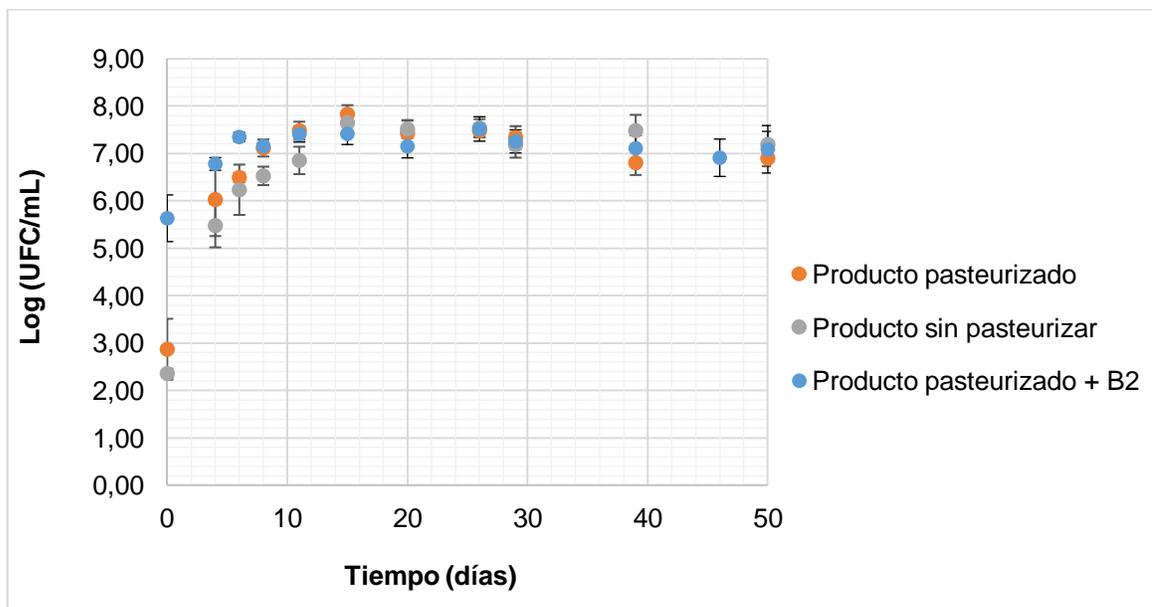


Figura 14. Recuento de B2® para el tratamiento 1 y recuento de mesófilos totales para los tratamiento 2 y 3, durante 50 días a 8 °C.

4.3.2 Efecto de B2® sobre las propiedades fisicoquímicas de un producto cárnico cocido

A partir de los resultados obtenidos a nivel *in vitro*, en donde se encontró que la cepa B2® prolongaba la fase de latencia de *L. monocytogenes* en caldo nutritivo BHI modificado a 8 °C, y acorde con lo descrito por varios autores como Bredholt *et al.*, 1999, 2001, Vermeiren *et al.*, 2004, 2006, quienes reportan el efecto inhibitorio de *L. sakei* frente a *L. monocytogenes* en refrigeración; se consideró importante evaluar el efecto de B2®, sobre las propiedades fisicoquímicas de un producto cárnico cocido, como respuesta a la aspersión de la bacteria ácido láctica, sobre el producto, durante 50 días de almacenamiento a condiciones de abuso de temperatura de refrigeración (8 °C).

Los productos cárnicos cocidos pueden ser el medio propicio para el crecimiento de microorganismos deteriorativos debido su alto contenido de humedad, pH cercanos a la neutralidad y alta *Aw* (Uyttendaele *et al.*, 1999). La presencia de este tipo de microorganismos en productos cárnicos origina cambios en los parámetros fisicoquímicos como pH, color, nitritos y textura asociados a deterioro. Teniendo en cuenta que la cepa biopreservante B2® es productora de ácido láctico (ver anexo 8.3), a continuación se muestra el efecto de esta sobre los siguientes parámetros fisicoquímicos de un producto cárnico cocido: porcentaje de sinéresis, pH, concentración de nitritos, color, proteólisis y textura.

- **Porcentaje de sinéresis y pH**

La sinéresis representada como la pérdida de fluido del producto (Vercammen *et al.*, 2011, González *et al.*, 2010), fue evaluada durante los 50 días de almacenamiento a 8 °C y presentó valores de 6 ± 0.39 , 4 ± 0.24 y $2\pm 1.08\%$ para los tratamientos 1, 2 y 3 respectivamente en el día 50 (Figura 16); siendo mayor para el tratamiento con B2®. Durante los primeros 10 días de seguimiento no se encontró diferencia entre los tratamientos, sin embargo a partir del día 20 se presentan diferencias significativas entre ellos, este comportamiento está directamente correlacionado con el descenso del

pH, que fue más acusado para el tratamiento 1 y 2 (Figura 15), con coeficientes de correlación negativos de -0,787, -0,85 y -0,587 para los tratamientos 1, 2 y 3 respectivamente, es decir a medida que disminuye el pH aumenta la sinéresis, razón por la cual el tratamiento con B2®, presenta mayor porcentaje de sinéresis al día 50.

La observación visual de limo o exudado lechoso sobre la superficie del producto, el cual es producido principalmente por bacterias ácido lácticas como *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc amelibiosum*, *Lactobacillus sake* y *Lactobacillus curvatus* (Björkroth y Korkeala, 1997; González *et al.*, 2010)., se puede asociar en este caso al crecimiento de BAL hasta niveles de 10^7 UFC/g de producto en el día 50 de almacenamiento a 8 °C, aunque este tipo de exudado no genera enfermedades en comparación con los producidos por otro tipo de microorganismos como patógenos, estas características están asociadas con la pérdida de calidad del producto, puesto que generan cambios de color, aroma y sabor (Samelis *et al.*, 2000; Montoya – Pérez *et al.*, 2013).

En relación con lo descrito anteriormente, se encontró que la disminución de pH, presentó diferencias significativas con una ($P < 0.05$), entre los tratamientos y en el tiempo (ver figura 15), siendo más rápido para el tratamiento 1 (producto pasteurizado + B2®), esto puede ser debido a que el nivel inicial de la cepa B2®, estaba alrededor de 10^6 UFC/g de producto, este fenómeno también lo observaron Hu *et al.*, (2008), al aplicar esta cepa biopreservante de la misma casa comercial.

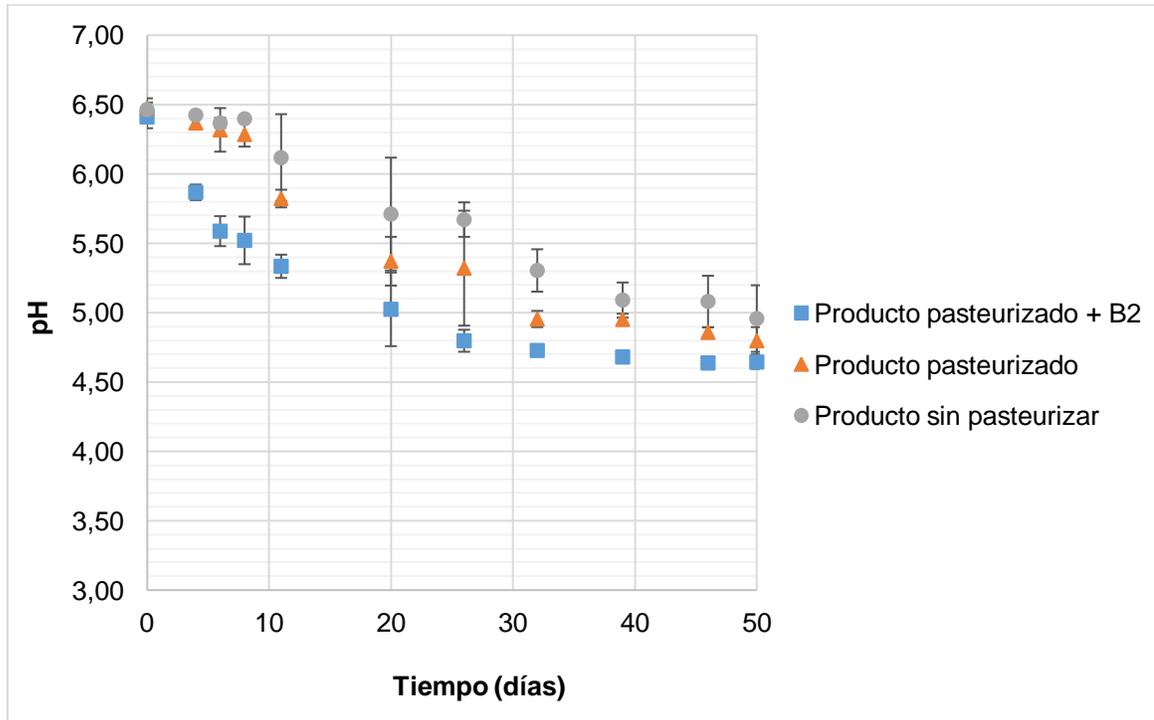


Figura 15. Seguimiento de pH, para los tres tratamientos durante 50 días a 8 °C

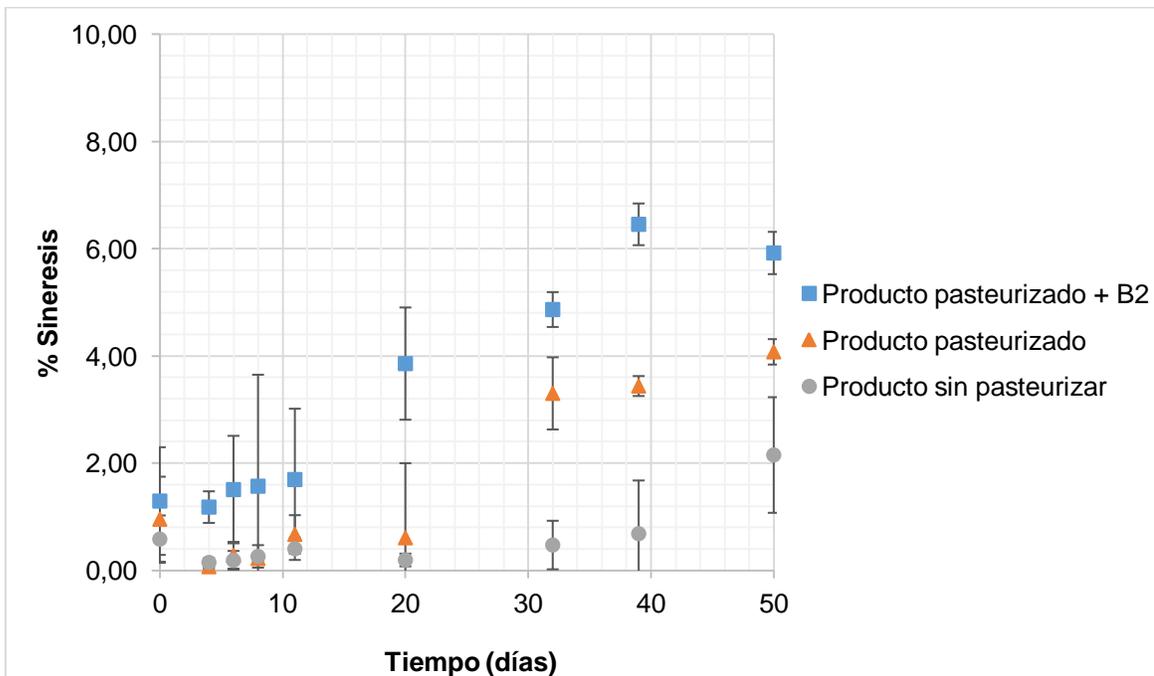


Figura 16. Seguimiento del % de sinéresis para los tres tratamientos, durante 50 días a 8 °C.

- **Proteólisis**

Se realizó el análisis de proteínas de los tres tratamientos durante el tiempo de evaluación por medio de electroforesis SDS PAGE y el método BCA, y se observó que la intensidad de las bandas fue disminuyendo a través del tiempo de almacenamiento. Por el método BCA se determinó con una probabilidad de ($p > 0,05$), que la concentración de proteína disminuyó en el tiempo para los tres tratamientos y no hubo diferencia significativa en el contenido de proteína entre estos (ver figura 17, 18 y anexo 8.2), esto puede deberse a las enzimas endógenas y proteinasas bacterianas producidas por las bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus plantarum* o *Lactobacillus casei* que pueden estar presentes en el producto y degradan las proteínas aumentando así la sinéresis al final del tiempo de evaluación, este mismo fenómeno lo observo Spaziani *et al.* (2009), quienes determinaron la relación de la proteólisis en salchichas de baja acidez con las enzimas bacterianas y encontraron que la degradación de las proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas se debe principalmente a las enzimas endógenas (calpaína y catepsina), y a proteasas de origen microbiano (Chaves-López, *et al.*, 2011).

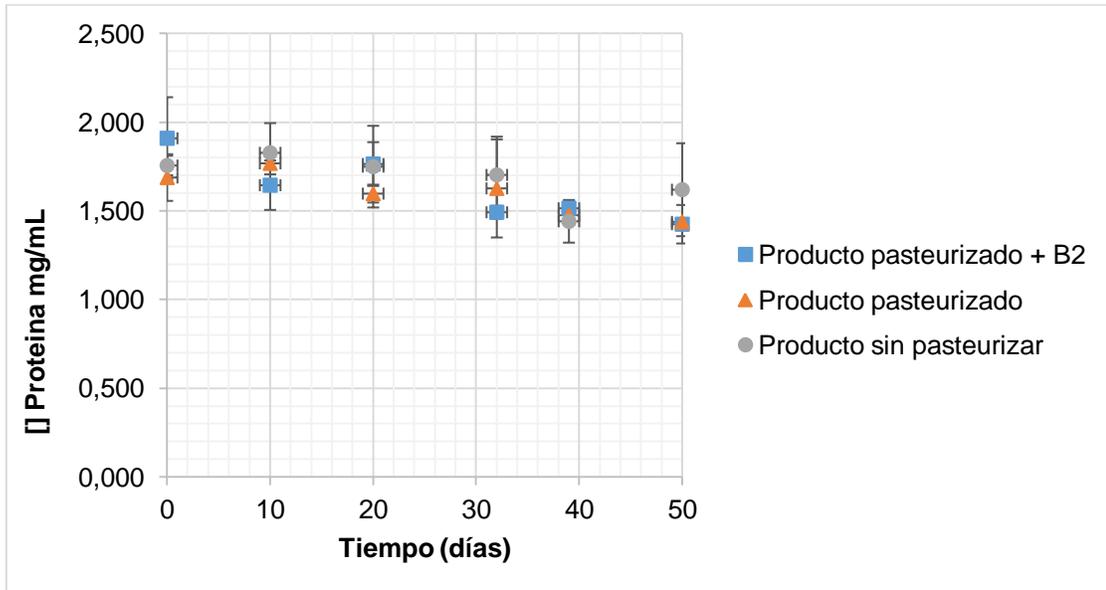


Figura 17. Seguimiento a la concentración de proteínas sarcoplásmicas para los tres tratamientos, durante 50 días a 8 °C

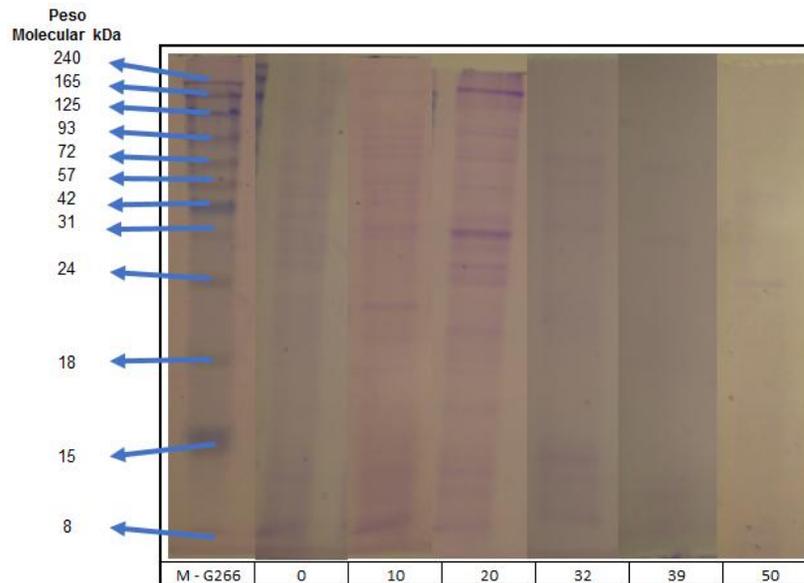


Figura 18. Perfiles electroforéticos del tratamiento 1 (Producto pasteurizado + B2®) en el tiempo (50 días).

- Nitritos y color

La concentración de NaNO_2 , se redujo a través del tiempo, siendo mayor para los tratamientos post-pasteurizados, con una velocidad de reducción de -1.667, -1.118 y -

1.053 ppm de NaNO_2 para los tratamientos 1, 2 y 3 respectivamente (Figura 19), en donde el límite de detección pudo ser cuantificado hasta el día 20, a partir de este día la concentración de nitritos fue menor a 1 ppm de NaNO_2 (Ver curva de calibración en el anexo 8.4). La máxima velocidad de reducción presentada por el tratamiento con B2® puede deberse a la mayor concentración de bacterias ácido lácticas que poseen un sistema enzimático con actividad nitrito reductasa que reducen la concentración de nitritos como lo explican Sobrino, (1993) y Salim Ammor y Mayo, (2007). A pesar de que los tratamientos 1 y 2 tuvieron una mayor reducción de nitritos, no hubo diferencias significativas entre ellos, pero como consecuencia de esta reducción se generaron cambios de color en el producto, para los tres tratamientos. Aunque visualmente no se observaron cambios en color, la coordenada de color a^* presentó diferencias significativas durante el tiempo de evaluación y entre los tratamientos. La luminosidad y la coordenada b^* , no presentaron diferencias significativas en el tiempo ni entre los tratamientos. El cambio de la coordenada a^* en el tiempo, se debe principalmente a la reducción de nitritos en el producto, en mayor grado para el tratamiento con B2®. Este mismo fenómeno se presentó en el estudio realizado por Myers *et al.*, 2013, quienes encontraron cambios en la luminosidad y la intensidad del color rojo y amarillo a medida que disminuía la concentración de NaNO_2 , (Figuras 20, 21 y 22) y se determinó que no hay diferencia significativa con $p > 0.05$ en el cambio de color (DE^*) en el tiempo pero si hay diferencia entre los tratamientos (figura 23).

Se determinó que hay una correlación positiva entre la disminución de nitritos con la disminución de pH para los tres tratamientos realizados, con coeficientes de correlación de 0.949, 0.929 y 0.882 para los tratamientos 1, 2 y 3 respectivamente. Autores como Marco *et al.*, (2006) y Honikel (2008), reportan que la reducción de nitritos durante el almacenamiento es más lento al aumentar el pH.

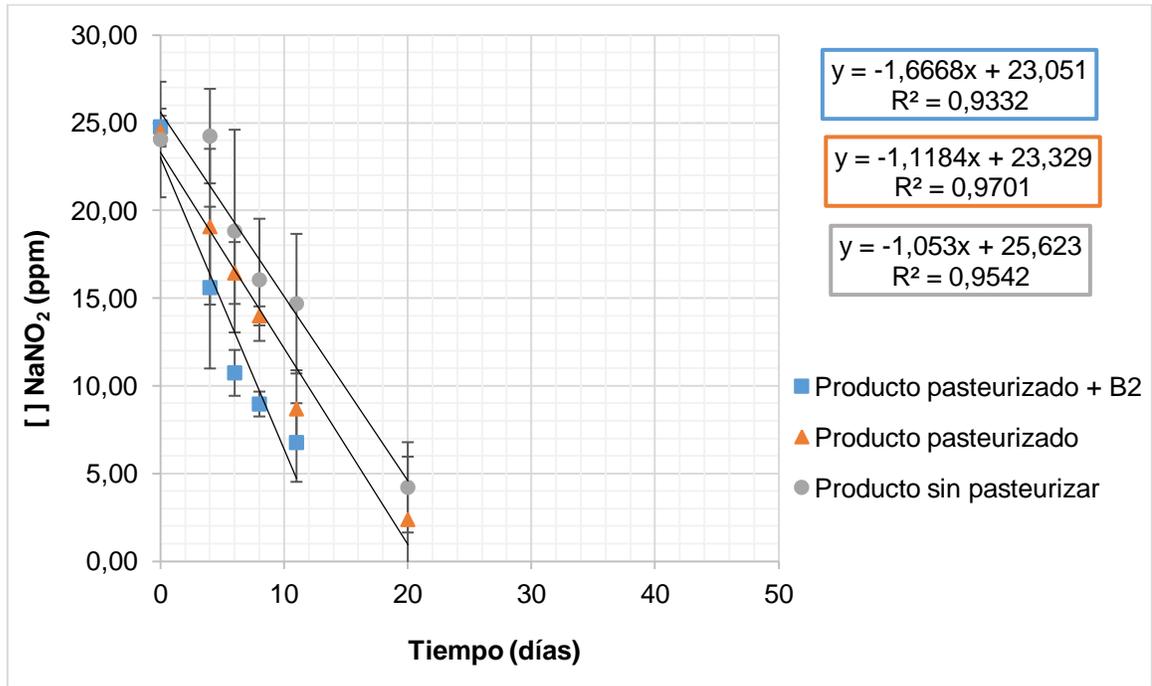


Figura 19. Seguimiento de la concentración de nitritos para los tres tratamientos, durante 50 días a 8 °C

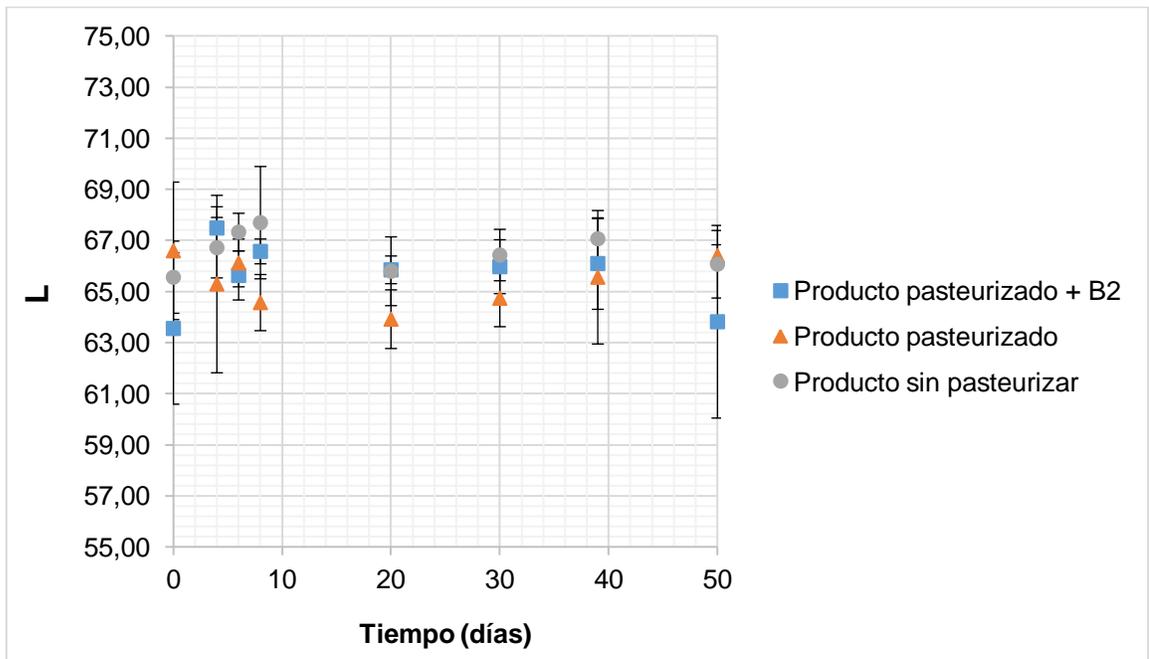


Figura 20. Seguimiento a la luminosidad (L) para los tres tratamientos, durante 50 días a 8 °C

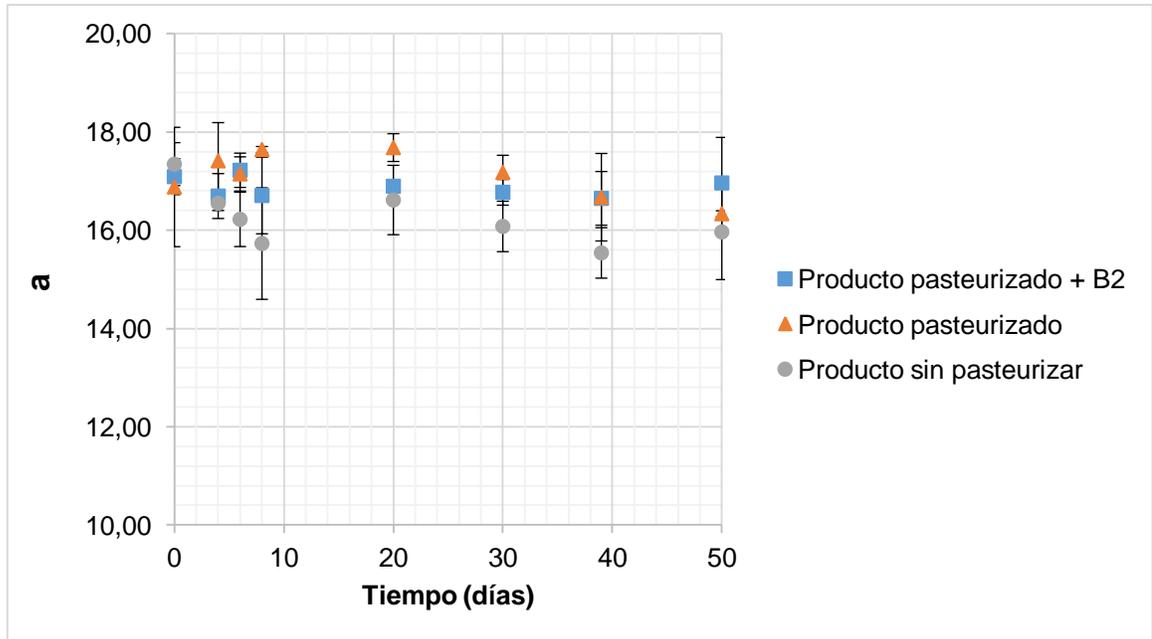


Figura 21. Seguimiento a la intensidad del color rojo (a) para los tres tratamientos, durante 50 días a 8 °C

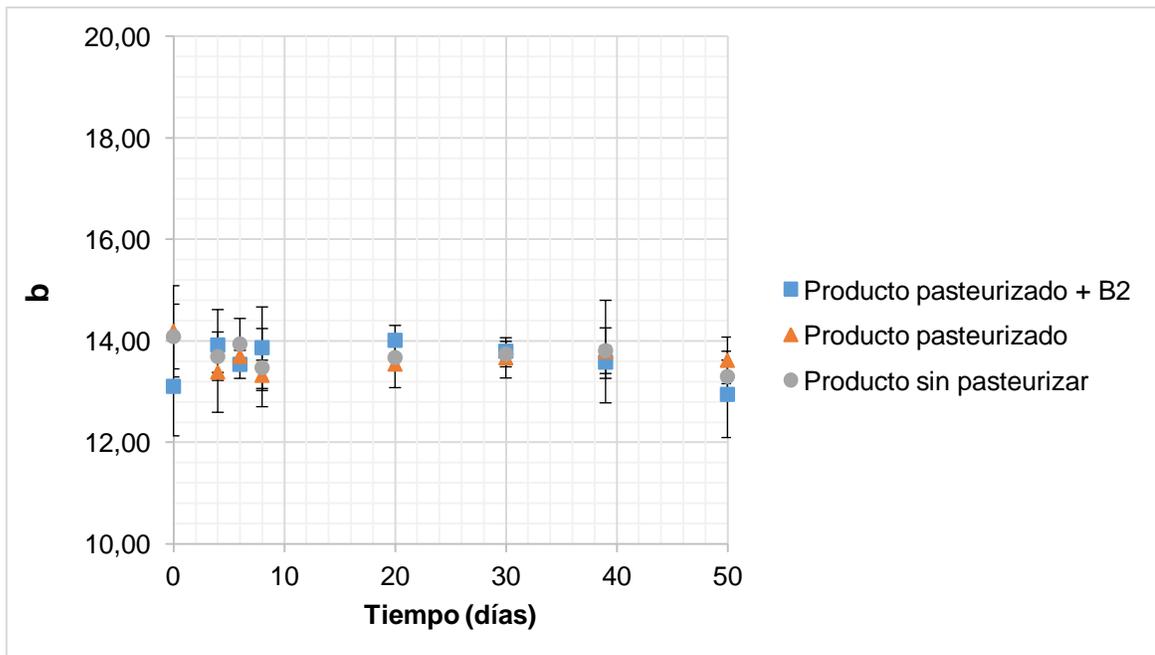


Figura 22. Seguimiento a la intensidad del color amarillo (b) para los tres tratamientos, durante 50 días a 8 °C

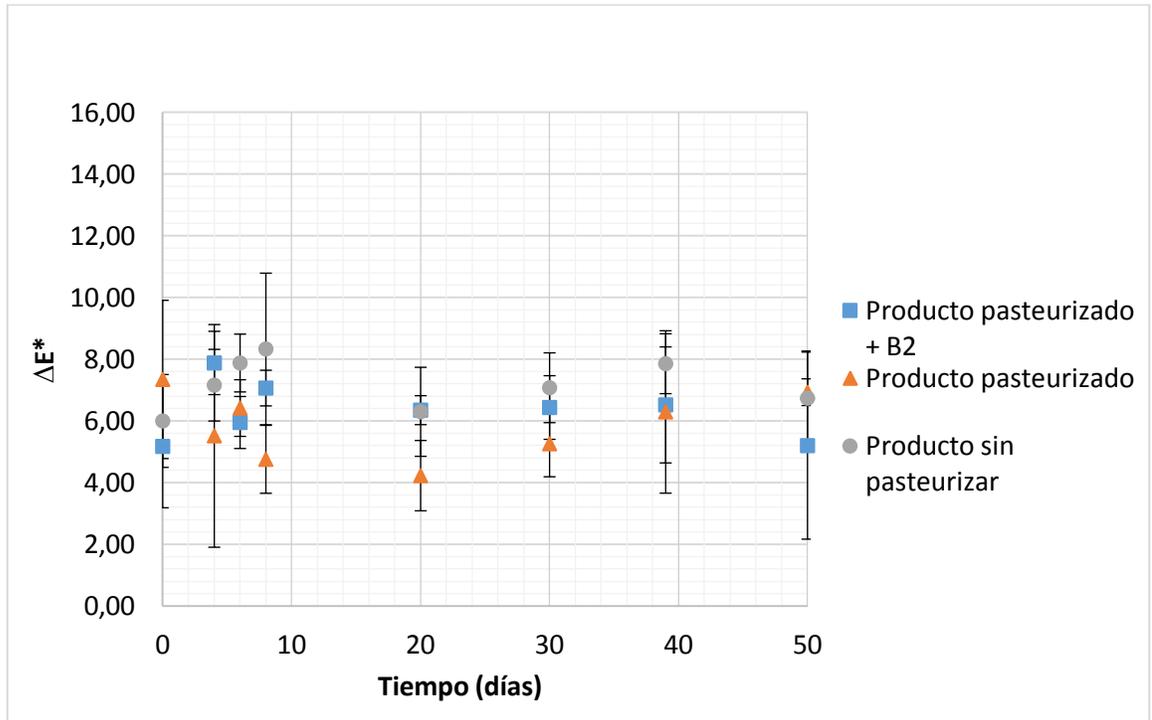


Figura 23. Seguimiento del cambio de color (ΔE^*), para los tres tratamientos, durante 50 días a 8 °C

- **Textura**

En los productos cárnicos emulsionados, la textura está relacionada con la capacidad de unirse el agua y la grasa durante la preparación de la emulsión y ser mantenida después del tratamiento térmico (Horita, *et al.*, 2011). La dureza como principal parámetro de calidad sensorial no presentó diferencias entre los tratamientos, pero si aumentó durante el tiempo de evaluación (figura 23), esto puede estar relacionado con la disminución de pH para el día 50 de almacenamiento, lo que ocasiona la pérdida de la capacidad de retención de agua de las proteínas (Horita *et al.*, 2011). Por otra parte la gomosidad presentó diferencias significativas durante el almacenamiento, pero no entre los tratamientos (ver figura 25) y se encontró que existe una correlación positiva entre la dureza y la gomosidad para los tres tratamientos con coeficientes de correlación de 0.908, 0.919 y 0.904 para los tratamientos 1, 2 y 3 respectivamente, lo

que indica que a medida que aumenta la dureza también aumenta la gomosidad, que es la energía requerida para desintegrar un alimento semisólido (Maldonado y Singh, 2008).

La cohesividad no mostró diferencias significativas durante el tiempo de evaluación ni entre los tratamientos y la adhesividad no mostró diferencias significativas en el tiempo pero si entre los tratamientos (figuras 24 y 26), siendo menor para el tratamiento 1 (producto pasteurizado + B2®) al día 50 de almacenamiento. Autores como Costa – Corredor *et al.*, 2009, encontraron mayor adhesividad en jamones con pH por encima de 6.0, quienes indican que a pH altos hay menor actividad proteolítica.

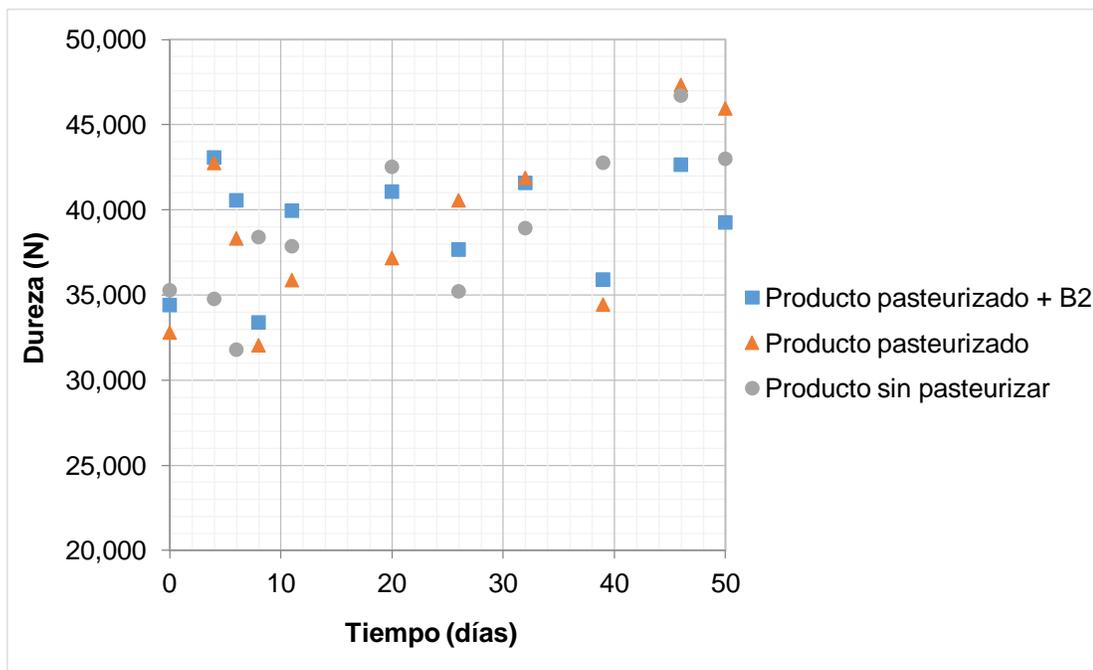


Figura 24. Seguimiento a la dureza para los tres tratamientos, durante 50 días a 8 °C

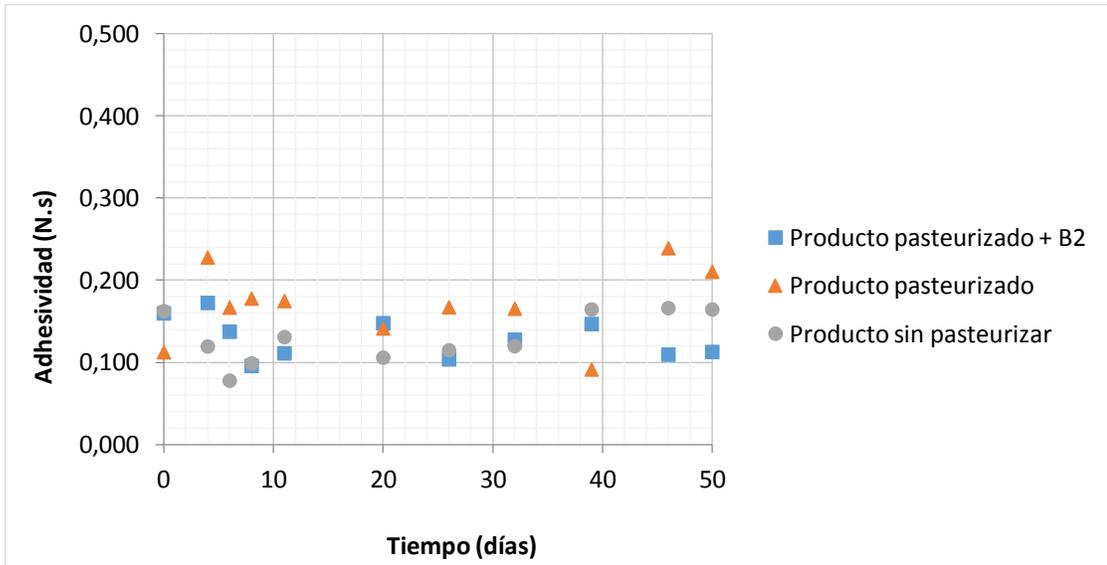


Figura 25. Seguimiento a la adhesividad para los tres tratamientos, durante 50 días a 8 °C

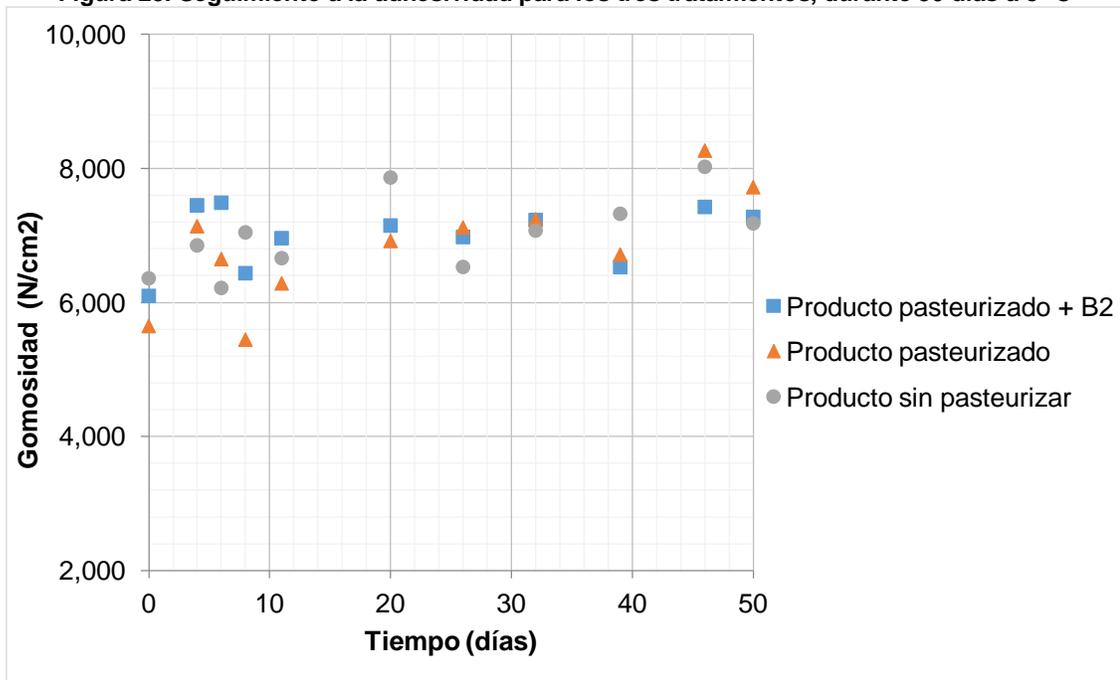


Figura 26. Seguimiento a la gomosidad para los tres tratamientos, durante 50 días a 8 °C

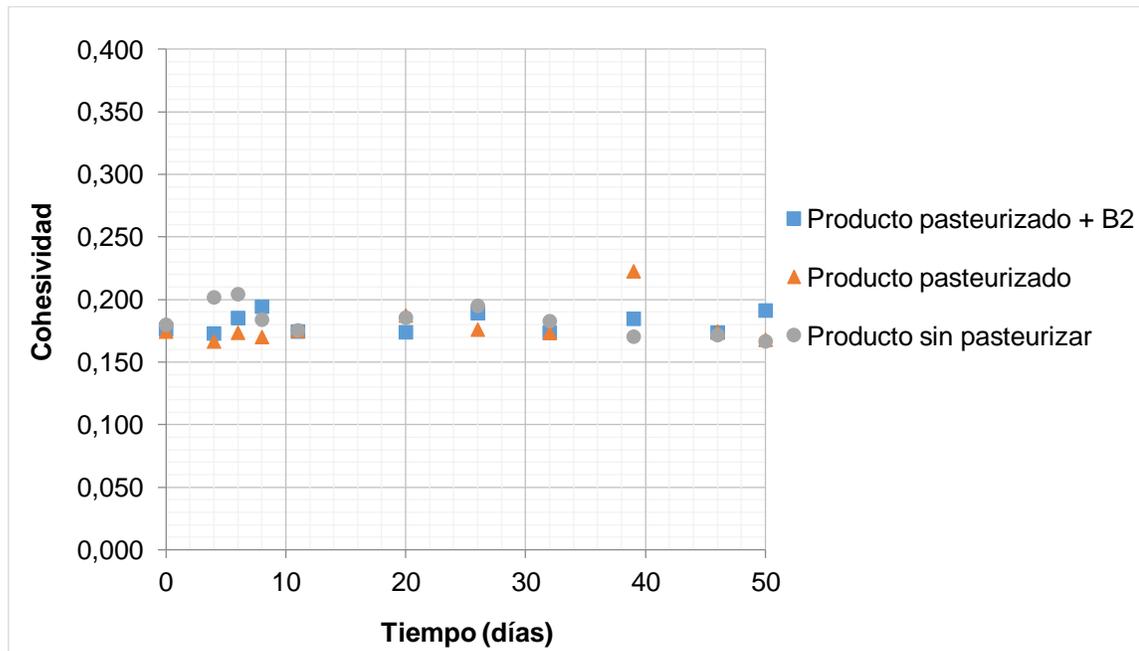


Figura 27. Seguimiento a la cohesividad para los tres tratamientos, durante 50 días a 8 °C

4.3.3 Efecto de B2® sobre la microbiota natural de un producto cárnico cocido

La microbiota natural de un producto cárnico cocido está compuesta principalmente por hongos, levaduras y BAL, ya que toleran la presencia de sal, nitritos, pH bajos y tienen carácter psicrotofo (Sobrino, 1993; Salim Ammor y Mayo, 2007).

Teniendo en cuenta lo anterior, se evaluaron dos tratamientos (1: Producto control y 2: Producto + B2®), a partir de los cuales se realizaron siembras de mesofilos totales en PCA para los dos tratamientos y recuento de la cepa B2® en agar MRS + amoxicilina, para diferenciar el conteo de la cepa biopreservante del resto de la BAL. En la figura 27, se muestra el comportamiento de los mesofilos totales en co-cultivo con B2®, los cuales empezaron en una concentración de 10^5 UFC/g de producto y la máxima concentración fue aproximadamente de 10^8 UFC/g de producto y una fase Lag de 2 días (ver tabala 5), por el contrario en el control, el recuento de mesofilos totales empezó en una concentración de 10^2 UFC/g y la concentración máxima fue de 10^8 UFC/g de producto y

no presento fase Lag, lo que indica que la cepa B2®, prolonga la fase Lag de la microbiota natural en 2 días.

Hu *et al.*, (2008), aplicaron la cepa biopreservante B2® en una concentración aproximada de 10^6 UFC/g en jamón cocido, para determinar el efecto de esta sobre la flora deteriorativa como lo son las BAL productoras de limo y determinaron que la cepa B2®, inhibe eficazmente el crecimiento de bacterias de descomposición dominantes en el jamón cocido como *L. sakei*, *Lactobacillus curvatus* y *Leuconostoc* durante el almacenamiento a 4 °C, y encontraron que la vida útil del producto inoculado con B2® fue de 35 días, en comparación con los 15 días del producto control.

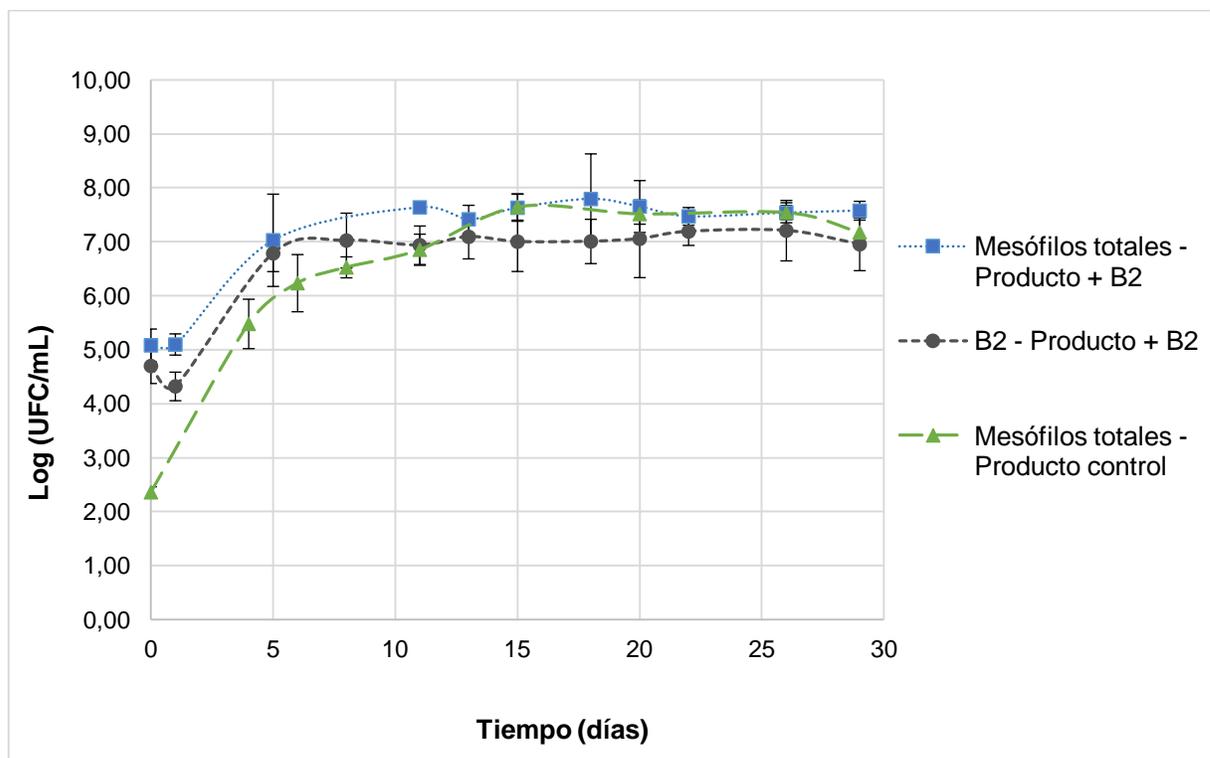


Figura 28. Efecto de B2® sobre la microbiota natural de un producto cárnico cocido a 8 °C

Tabla 5. Parámetros de crecimiento de B2® y mesófilos totales en un producto cárnico

	CURVA	RATE (μ)	LAG (λ)	Y0	Y máx.	SE (FIT)	R^2_STAT
Producto	B2®	1,878	3,731	4,510	7,052	0,134	0,982
	Mesófilos totales + B2®	0,703	2,192	5,082	7,590	0,117	0,986
	Mesófilos totales	0,626		2,540	7,301	0,355	0,947

4.3.4 Efecto de B2® sobre *L. monocytogenes* en un producto cárnico cocido

Se evaluó el efecto de la cepa B2® sobre *L. monocytogenes* en un producto cárnico cocido (ver figura 28), y se determinó que B2® inactivó las células de *L. monocytogenes* a un nivel menor al nivel de detección, a diferencia de la evaluación a nivel *in vitro* descrita en el numeral 4.2.1, en la cual la cepa B2®, combinado con la aplicación nitritos prolongaron la fase Lag de *L. monocytogenes* en 11 días (ver tabla 6). Al comparar el comportamiento a nivel *in vitro* de la cepa B2® con el comportamiento en producto, se observó que esta cepa aumentó su nivel inicial en 3 ciclos logarítmicos, mientras que a nivel *in vitro* presentó crecimiento estacionario y esto se pudo deber a que esta cepa biopreservante es anaerobia (ver anexo 8.3), lo que indica que crece mejor en un ambiente en ausencia de oxígeno. Por otra parte, *L. monocytogenes*, también presentó un comportamiento diferente a nivel *in vitro*, comparado con el comportamiento en producto, donde la máxima concentración de *L. monocytogenes* fue de 10^4 UFC/g de producto, por el contrario a nivel *in vitro* a 100 ppm de NaNO_2 , la concentración máxima de *L. monocytogenes* fue de 10^8 UFC/mL. Esto puede sugerir que hubo una mayor producción de ácido láctico por parte de la cepa B2® en el producto, al presentar una mayor velocidad de crecimiento, lo que produjo la inactivación de *L. monocytogenes*, este mismo fenómeno lo evidenciaron Alves *et al.*, (2006), quienes determinaron que la inhibición de *L. monocytogenes* se debió a la producción de ácido láctico por parte de *L. sakei*.

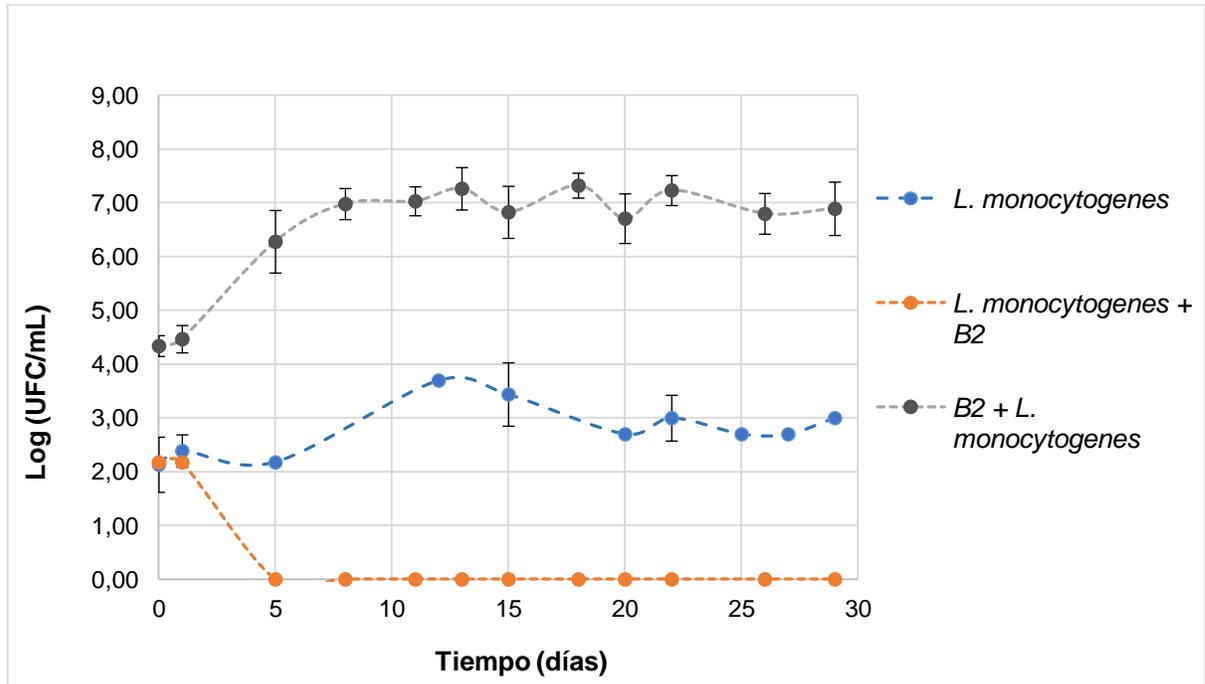


Figura 29. Efecto de B2® sobre *L. monocytogenes* en un producto cárnico cocido a 8 °C

Tabla 6. Parámetros de crecimiento de B2® y *L. monocytogenes* a nivel *in vitro* y en producto

	CURVA	RATE (μ)	LAG (λ)	Y ₀	Y máx.	SE (FIT)	R ² _STAT
<i>In vitro</i>	B2® - 100 ppm NaNO ₂	0,079	21,959	6,312		0,185	0,403
	B2® + <i>L. monocytogenes</i> - 100 ppm NaNO ₂	0,021		6,39		0,213	0,438
	<i>L. monocytogenes</i> - 100 ppm NaNO ₂	0,532		3,04	8,171	0,272	0,979
	<i>L. monocytogenes</i> + B2® - 100 ppm NaNO ₂	1,265	11,216	3,446	7,671	0,427	0,959
Producto	B2®	1,878	3,731	4,510	7,052	0,134	0,982
	B2® + <i>L. monocytogenes</i>	0,411		4,215	7,013	0,220	0,954
	<i>L. monocytogenes</i>	0,020		2,481		0,489	0,076

5 CONCLUSIONES

- Se rechaza la hipótesis formulada porque la cepa B2®, no presenta el mismo efecto inhibitor sobre los cuatro patógenos estudiados y afecta las propiedades fisicoquímicas del producto.
- Se evaluó el crecimiento a nivel *in vitro* para *L. monocytogenes* y se observó que la cepa B2® en combinación con nitritos presentaron un efecto sinérgico en el crecimiento estacionario de *L. monocytogenes* a 200 ppm y la prolongación de la fase Lag en 11 días a 100 ppm de NaNO₂.
- El crecimiento a nivel *in vitro* para *S. enteritidis*, presentó inactivación tanto en monocultivo como en co-cultivo con B2® a 200 ppm; sin embargo a 100 ppm aumentó en un ciclo logarítmico al día 30 tanto en monocultivo como en co-cultivo con B2®.
- El crecimiento a nivel *in vitro* para *E. coli* y *S. aureus*, presentó inactivación en monocultivo y en co-cultivo con B2®, esto puede asociarse a que bajo las condiciones evaluadas (Temperatura y concentración de nitritos), no se favorece el crecimiento de éstos patógenos.
- *S. enteritidis*, *E. coli* y *S. aureus* en co-cultivo con *L. monocytogenes* y la cepa B2® a nivel *in vitro* presentaron inactivación menor al nivel de detección por medio de recuento en placa, debido a las condiciones de temperatura no óptimas para su crecimiento y al agotamiento de los nutrientes asociado al crecimiento de *L. monocytogenes*.
- Se validó que la cepa B2® presentó mayor velocidad de crecimiento en producto comparado con la evaluación a nivel *in vitro*, inactivando *L. monocytogenes* a los cinco días de almacenamiento refrigerado.

- La cepa B2® provocó un descenso rápido del pH en el producto, lo que generó una disminución más acusada de la concentración de nitritos y un aumento de la sinéresis; produciendo cambios visuales de deterioro.
- La bacteria ácido láctica B2® presentó efecto inhibitorio sobre *L. monocytogenes* prolongando la fase Lag de este patógeno en 11 días y en dos días para la microflora natural y provocó un descenso rápido del pH, lo que generó una disminución de la concentración de nitritos y un aumento de la sinéresis en el producto.
- En términos generales el efecto de la bacteria ácido láctica biopreservante B2® en productos cárnicos cocidos listos para el consumo y almacenados en refrigeración, genera cambios organolépticos en el producto relacionados con el aumento de sinéresis a partir del día 20, lo que puede influir en una apreciación negativa por parte del consumidor.

6 RECOMENDACIONES

- Se recomienda evaluar el efecto de la cepa B2®, sobre *S. enteritidis*, *E. coli* y *S. aureus* a temperaturas de abuso de refrigeración mayores (10 y 12 °C) a nivel *in vitro* con nitritos y sin nitritos y en producto.
- Realizar la búsqueda de nuevas técnicas de cuantificación de proteínas, que permitan evaluar de una manera eficaz los cambios proteolíticos causados por la cepa B2®.
- Utilizar otro tipo de metodología en la evaluación del efecto de la cepa B2®, sobre la microbiota natural de un producto cárnico cocido, que permita identificar, cuantificar y diferenciar el crecimiento de esta cepa con el crecimiento de la microflora natural como el análisis de PCR en tiempo real.
- Evaluar sensorialmente la aplicación de la cepa biopreservante B2® en el producto cárnico evaluado para complementar el estudio de viabilidad.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Alba. M., Bravo. D., Medina. M. 2013. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in dry-cured ham by high-pressure treatments combined with biopreservatives. *Food Control* 31. 508 - 513
- Alves. V.F, Martínez. R.C.R, Lavrador. M.A.S, De Martinis E.C.P. 2006. Antilisterial activity of lactic acid bacteria inoculated on cooked ham. *Meat Science* 74. 623-627.
- Amezquita, A., Brashears, M.M., 2002. Competitive inhibition of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat products by lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection* 65 (2), 316– 325.
- Amos, N. D., Willix, J., Chadertton, T., North, M.F. 2008. A compilation of correlation parameters for predicting the enthalpy and thermal conductivity of solid foods within the temperature range of -40 °C to 40 °C. *International Journal of Refrigeration* 31. 1293 – 1298.
- Ananou. S., Baños. A., Maqueda. M., Martínez-Bueno. M., Gálvez. A., Valdivia. E. 2010. Effect of combined physico-chemical treatments based on enterocin AS-48 on the control of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in a model cooked ham. *Food Control* 21. 478–486.
- Andersen, L. 1995. Biopreservation with FloraCarn L-2. *Fleisch- wirtschaft*, 75, 705–706, 711–712.
- Andersen, L. 1997. Bioprotective culture for fresh sausage. *Fleisch- wirtschaft*, 77, 635–637.
- Antwi. M, Bernaerts. K, Van Impe. J.F, Geeraerd. A.H. 2007. Modelling the combined effects of structured food model system and lactic acid on *Listeria innocua* and *Lactococcus lactis* growth in mono and co-culture. *International Journal of Food Microbiology* 120. 71-84.
- Antwi. M, Theys. T.E, Bernaerts. K, Van Impe. J.F, Geeraerd. A.H. 2008. Validation of a model for growth of *Lactococcus lactis* and *Listeria innocua* in a structured gel

system: Effect of monopotassium phosphate. *International Journal of Food Microbiology* 128. 320-329.

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1990. *Official Methods of Analysis*. 15th Edition. Pp 1298.
- Baranyi, J. & Roberts, T.A. 1994. A dynamic approach to predict bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277-294.
- Badui, S. 1981. *Química de los alimentos*. Universidad Nacional Autónoma de México. Ed. Alhambra Mexicana S.A. México. pp 430.
- Bredholt. S, Nesbakken. T, Holck. A. 1999. Protective cultures inhibit growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in cooked, sliced, vacuum and gas packaged meat. *International Journal of Food Microbiology* 53. 43 -52.
- Bredholt. S, Nesbakken. T, Holck. A. 2001. Industrial application of an antilisterial strain of *Lactobacillus sakei* as a protective culture and its effect on the sensory acceptability of cooked, sliced, vacuum-packaged meats. *International Journal of Food Microbiology* 66. 191-196.
- Bjorkroth, J., Korkeala, H. 1997. Ropy slime-producing *Lactobacillus sakei* strains possess a strong competitive ability against commercial biopreservatives. *International Journal of Food Microbiology*. 38. 117 – 123.
- Carr, F.J., Chill, D. y Maida, N. 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4), 281-370.
- Castro. M.P, Palavecino. N.Z., C. Herman, Garro. O.A, Campos. C.A. 2011. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. *Meat Science*, 87, 321-329.
- Chaves-López. C, Paparella. A, Tofalo. R, Suzzi. G. 2011. Proteolytic activity of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with Italian dry-fermented sausages in a model system. *International Journal of Food Microbiology* 150. 50-58.

- Cizeikiene. D, Juodeikiene. G, Paskevicius. A, Bartkiene. E. 2013. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *Food Control* 31. 539 – 545.
- Costa-Corredor, A., Serra, X., Arnau, J., Gou, P. 2009. Reduction of NaCl content in restructured dry-cured hams: Post-resting temperature and drying level effects on physicochemical and sensory parameters. *Meat Science*. 83. 390 – 397.
- David, J., Steenson, L., Davidson, M. 2013. Expectations and Applications of Natural Antimicrobials to Foods: A Guidance Document for Users, Suppliers, Research and Development, and Regulatory Agencies. *Food Protection Trends*, 33 (4), 241–250.
- Devlieghere, F., Geeraerd, A., Versyck, K., Bernaert, H., Van Impe J. & Debevere, J. 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.
- Dos Santos. A. 2007. Estudio del comportamiento cinético de microorganismos de interés en seguridad alimentaria con modelos matemáticos. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Pp. 255.
- Espinal, C., Martínez, H., Acevedo, X. 2005. La cadena de la carne bovina en Colombia, una mirada global de su estructura y dinámica. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural – Observatorio Agrocadenas Colombia. pp 43. 19 de abril de 2012, disponible en: http://www.agronet.gov.co/www/docs_agronet/2005112144930_caracterizacion_bovina.pdf
- FDA. 2012. Bad Bug Book - Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins
- Girard, J. P. 1991. Tecnología de la carne y de los productos cárnicos. Ed. Acribia S.A. Zaragoza – España. pp 300.

- González, B., Díez, V. 2002. The effect of nitrite and starter culture on microbiological quality of “chorizo”—a Spanish dry cured sausage. *Meat Science*. 60. 295 – 298.
- González, M., Suarez, H., Martínez, O. 2009. Análisis estructural de la carne de jamón durante el proceso de cocción y temperatura de almacenamiento. *Revista MVZ Córdoba*. 14 (3). 1803 – 1811.
- González, M., Suarez, H., Martínez, O. 2010. Influencia del Proceso de Cocción y Temperatura de Almacenamiento Sobre las Características Fisicoquímicas, Microbiológicas y Sensoriales del Jamón de Cerdo. *Revista Colombiana Ciencias Pecuarias*. 23 (3) pp. 336-348.
- Holzapfel. W.H, Geisen. R, Schillinger. U. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocinas and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology* 24. 343 – 362.
- Honikel, K. 2008. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science*. 78. 68 – 76.
- Horita. C.N, Morgano. M.A, Celeghini. R.M.S, Pollonio. M.A.R. 2011. Physicochemical and sensory properties of reduced-fat mortadella prepared with blends of calcium, magnesium and potassium chloride as partial substitutes for sodium chloride. *Meat Science* 89. 426-423.
- Hu. P, Xu. X.L, Zhou. G.H, Han. Y.Q, Xu. B.C, Liu. J.C. 2008. Study of the *Lactobacillus sakei* protective effect towards spoilage bacteria in vacuum packed cooked ham analyzed by PCR–DGGE. *Meat Science* 80, 462-469.
- Hwang, A., Huang, L. 2010. Ready-to-eat foods: microbial concerns and control measures. CRC Press. Estados Unidos. Pp. 259.
- ICONTEC – NTC 1325, 2008. Industrias Alimentarias. Productos Cárnicos Procesados No Enlatados. Pp 38.

- Jofré, A., Garriga, M., Aymerich, T. 2008. Inhibition of *Salmonella* sp, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in cooked ham by combining antimicrobials, high hydrostatic pressure and refrigeration. *Meat Science* 78, 53 – 59.
- Juven, B. J., Barefoot, S. F., Pierson, M. D., McCaskill, L. H., Smith, B. 1998. Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged ground beef inoculated with *Lactobacillus alimentarius* FloraCarn L-2. *Journal of Food Protection*, 61, 551–556
- Liu, G. Wang, Y. Gui, M. Zheng, H. Dai, R. Li, P. 2012. Combined effect of high hydrostatic pressure and enterocin LM – 2 on the refrigerated shelf life of ready to eat sliced vacuum packed cooked ham. *Food Control*, 24, 64 – 71.
- Maldonado, S., Singh, J. 2008. Efecto de gelificantes en la formulación de dulce de yacón. *Ciência e Tecnologia de Alimentos - Campinas*, 28(2). 429 – 434.
- Marco, A., Navarro, J., Flores, M. 2006. The influence of nitrite and nitrate on microbial, chemical and sensory parameters of slow dry fermented sausage. *Meat Science*. 73. 660 – 673.
- Martín-Sánchez. A.M, Chaves-López. C, Sendra. E, Sayas. E, Fernández-López. J, Pérez-Álvarez. J.A. 2011. Lipolysis, proteolysis and sensory characteristics of a Spanish fermented dry-cured meat product (salchichón) with oregano essential oil used as surface mold inhibitor. *Meat Science* 89. 35-44.
- Mellefont, L., McMeekin, T., Ross, T. 2008. Effect of relative inoculum concentration on *Listeria monocytogenes* growth in co-culture. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 157 – 168
- Montoya Pérez, L., Restrepo Molina, D., Suárez Mahecha, H. 2013. Influencia del Alginato de Sodio sobre la Sinéresis en Jamón Cocido. Consultado el 5 de diciembre de 2013. Disponible en: <http://mundolacteoycarnico.com/category/mundo-lacteo-y-carnico/>

- Mora Soler, L. 2010. Determinación de compuestos bioquímicos para el control de calidad en la elaboración de jamón cocido y jamón curado. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. España. pp. 282.
- Muntal, B. 2007. Mejora de la seguridad alimentaria en productos cárnicos listos para el consumo mediante la aplicación combinada de tecnologías emergentes. Tesis Doctoral. Universitat de Girona. Cataluña. Pp 145.
- Myers, K., Cannon, J., Montoya, D., Dickson, J., Lonergan, S., Sebranek, J. 2013. Effects of high hydrostatic pressure and varying concentrations of sodium nitrite from traditional and vegetable-based sources on the growth of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat (RTE) sliced ham. *Meat Science*, 94, 69-76.
- Office of Food Additive (HFS-200). 2004. Certification of *Carnobacterium* strains as GRAS. Burdock Group Consultants.
- O’Keeffe, T., & Hill, C. 1999. Bacteriocins. In R. K. Robinson, C. A. Batt, & P. D. Patel (Eds.), *Encyclopedia of food microbiology* (pp. 183–191)
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2012. Enfermedades de transmisión alimentaria. Consultado el 28 de octubre de 2012. Disponible en: http://www.who.int/topics/foodborne_diseases/es/
- Ossa, J., Coral, A., Vanegas, M. 2010. Microbiota de jamones de cerdo cocidos asociada al deterioro por abombamiento del empaque. *Revista MVZ Córdoba*, 15 (2), 2078 – 2086.
- Ray Bibek. 2003. *Fundamental Food Microbiology*. CRC. Press. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data.
- Rodríguez, J. M., Martínez, M. I., Horn, N., Dodd, H. M. 2002. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 80, 101–116.
- Sanz, Y., Vila, R., Toldra, F., Nieto, P., Flores, J. 1997. Effect of nitrate and nitrite curing salts on microbial changes and sensory quality of rapid ripened sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 37. 225 – 229.

- Salim – Ammor, M., Mayo, B. 2007. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Science*. 76, 138 – 146.
- Samelis, J., Kakouri, A., Rementzis, J., 2000. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4 °C. *Food Microbiology* 17, 329–340.
- Slongo, A., Rosenthal, A., Quaresma, L., Deliza, R., Mathias, S., Falcão de Aragão, G. 2009. Modeling the growth of lactic acid bacteria in sliced ham processed by high hydrostatic pressure. *LWT - Food Science and Technology*. 42. 303 – 306.
- Spaziani, M., Del Torre, M., Stecchini, M. 2009. Changes of physicochemical, microbiological, and textural properties during ripening of Italian low-acid sausages. Proteolysis, sensory and volatile profiles. *Meat Science*. 81. 77 – 85.
- Sobrino. O.J. 1993. Caracterización parcial, bioquímica e inmunológica, de una sustancia antimicrobiana producida por *Lactobacillus sake* 148. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. España. Pp 293.
- Steele, R. 2004. Understanding and measuring the shelf-life of food. Wood head Publishing Limited. Cambridge. Pp 407.
- Tecnova. 2013. Informe de Análisis de Inteligencia Competitiva en Proyectos Universidad – Empresa cofinanciados por Colciencias – Proyecto Elaboración de Embutidos Cárnicos 221-2010. Colombia. Pp 80.
- Universidad Nacional de Colombia. 2004. Curso Virtual Industrias Cárnicas. Consultado el 17 de agosto de 2012. Disponible en: <http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/agronomia/2001819/index.html>
- Uyttendaele, M., De Troy, P., Debevere, J., 1999. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different types of meat products on the Belgian retail market. *International Journal of Food Microbiology* 53 (1), 75–80.

- Vásquez. S, Suárez. H, Zapata. S. 2009. Utilización de Sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. Revista Chilena de Nutrición. 36 (1).
- Vereecken. K.M., Devlieghere. F., Bockstaele. A, Debevere. J, Van Impea. J.F. 2003. A model for lactic acid-induced inhibition of *Yersinia enterocolitica* in mono- and co-culture with *Lactobacillus sakei*. Food Microbiology 20. 701 – 713.
- Vermeiren, L. Devlieghere, F. Debevere. J. 2004. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. International Journal of Food Microbiology 96, 149 – 164.
- Vermeiren. L. 2006. Biopreservation of anaerobically packaged sliced cooked meat products by non-bacteriocinogenic micro-organisms. Universiteit Gent. Pp. 306.
- Vercammen, A., Kristof, G.A., Lurquin, I., Steen, L., Geomaere, O., Szczepaniak, S., Paelinck, H., Hendrickx, M. and Michiels, C. 2011. Shelf – life extension of cooked ham model product by high hydrostatic pressure and natural preservatives. Innovative Food science and Emerging Technologies. 12. 407 – 415.

8 ANEXOS

8.1 COEFICIENTES DE CORRELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES PARA LOS TRES TRATAMIENTOS EVALUADOS EN EL NUMERAL 4.3.1

Tabla 7. Coeficientes de correlación para el tratamiento 1 (Producto pasteurizado + B2®)

	<i>Día</i>	<i>B2</i>	<i>pH</i>	<i>Sinéresis</i>	<i>Proteína</i>	<i>Dureza</i>	<i>Cohesividad</i>	<i>Adhesividad</i>	<i>Gomosidad</i>	<i>Nitritos</i>	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
<i>Día</i>	1,000												
<i>B2</i>	0,324	1,000											
<i>pH</i>	-0,891	-0,629	1,000										
<i>Sinéresis</i>	0,889	0,295	-0,787	1,000									
<i>Proteína</i>	-0,768	-0,539	0,765	-0,653	1,000								
<i>Dureza</i>	0,105	0,200	-0,152	-0,057	-0,199	1,000							
<i>Cohesividad</i>	0,073	0,069	-0,026	0,038	-0,124	-0,617	1,000						
<i>Adhesividad</i>	0,191	0,233	-0,247	-0,088	-0,189	0,067	0,266	1,000					
<i>Gomosidad</i>	0,135	0,266	-0,170	-0,077	-0,270	0,908	-0,235	0,216	1,000				
<i>Nitritos</i>	-0,809	-0,676	0,949	-0,739	0,622	-0,166	-0,032	-0,206	-0,191	1,000			
<i>L</i>	-0,148	0,171	-0,036	-0,114	0,049	-0,001	-0,183	-0,245	-0,102	-0,126	1,000		
<i>a</i>	-0,108	-0,104	0,131	0,004	0,173	0,042	-0,028	0,069	0,042	0,164	-0,634	1,000	
<i>b</i>	-0,175	0,140	-0,017	-0,007	0,260	0,047	-0,329	-0,226	-0,119	-0,191	0,785	-0,237	1,000

Tabla 8. Coeficientes de correlación para el tratamiento 2 (Producto pasteurizado)

	<i>Día</i>	<i>MT</i>	<i>pH</i>	<i>Sinéresis</i>	<i>Proteína</i>	<i>Dureza</i>	<i>Cohesividad</i>	<i>Adhesividad</i>	<i>Gomosidad</i>	<i>Nitritos</i>	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
<i>Día</i>	1,000												
<i>MT</i>	0,462	1,000											
<i>pH</i>	-0,943	-0,544	1,000										
<i>Sinéresis</i>	0,883	0,196	-0,850	1,000									
<i>Proteína</i>	-0,637	-0,186	0,544	-0,496	1,000								
<i>Dureza</i>	0,406	0,158	-0,391	0,261	-0,110	1,000							
<i>Cohesividad</i>	0,164	0,138	-0,187	0,202	-0,232	-0,653	1,000						
<i>Adhesividad</i>	-0,129	-0,164	0,024	0,158	-0,051	-0,450	0,545	1,000					
<i>Gomosidad</i>	0,542	0,271	-0,546	0,374	-0,221	0,919	-0,348	-0,215	1,000				
<i>Nitritos</i>	-0,875	-0,706	0,929	-0,734	0,422	-0,348	-0,217	0,004	-0,532	1,000			
<i>L</i>	0,012	-0,376	0,083	0,090	-0,165	-0,039	-0,157	-0,168	-0,201	0,248	1,000		
<i>a</i>	-0,402	0,201	0,314	-0,502	0,400	-0,070	-0,034	-0,009	-0,017	0,148	-0,816	1,000	
<i>b</i>	-0,017	-0,347	0,024	0,028	-0,085	0,073	-0,276	0,027	-0,050	0,175	0,799	-0,615	1,000

Tabla 9. Coeficientes de correlación para el tratamiento 3 (Producto sin pasteurizar)

	<i>Día</i>	<i>MT</i>	<i>pH</i>	<i>Sinéresis</i>	<i>Proteína</i>	<i>Dureza</i>	<i>Cohesividad</i>	<i>Adhesividad</i>	<i>Gomosidad</i>	<i>Nitritos</i>	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
<i>Día</i>	1,000												
<i>MT</i>	0,610	1,000											
<i>pH</i>	-0,949	-0,600	1,000										
<i>Sinéresis</i>	0,636	0,065	-0,587	1,000									
<i>Proteína</i>	-0,421	-0,087	0,546	-0,335	1,000								
<i>Dureza</i>	0,470	0,314	-0,454	0,146	-0,105	1,000							
<i>Cohesividad</i>	-0,372	-0,032	0,380	-0,306	0,488	-0,783	1,000						
<i>Adhesividad</i>	-0,314	0,195	0,361	-0,333	0,430	-0,518	0,714	1,000					
<i>Gomosidad</i>	0,352	0,373	-0,329	-0,032	0,213	0,904	-0,464	-0,245	1,000				
<i>Nitritos</i>	-0,892	-0,718	0,882	-0,408	0,413	-0,493	0,392	0,275	-0,380	1,000			
<i>L</i>	-0,076	0,206	0,159	-0,047	0,023	-0,048	0,208	0,150	0,087	0,108	1,000		
<i>a</i>	-0,410	-0,478	0,289	-0,250	0,082	-0,210	0,105	0,054	-0,206	0,377	-0,798	1,000	
<i>b</i>	-0,288	-0,172	0,201	-0,133	-0,040	-0,115	0,134	0,185	-0,005	0,287	0,232	0,148	1,000

8.2 PERFILES ELECTROFORÉTICOS DE LOS TRES TRATAMIENTOS EVALUADOS EN EL NUMERAL 4.3.1

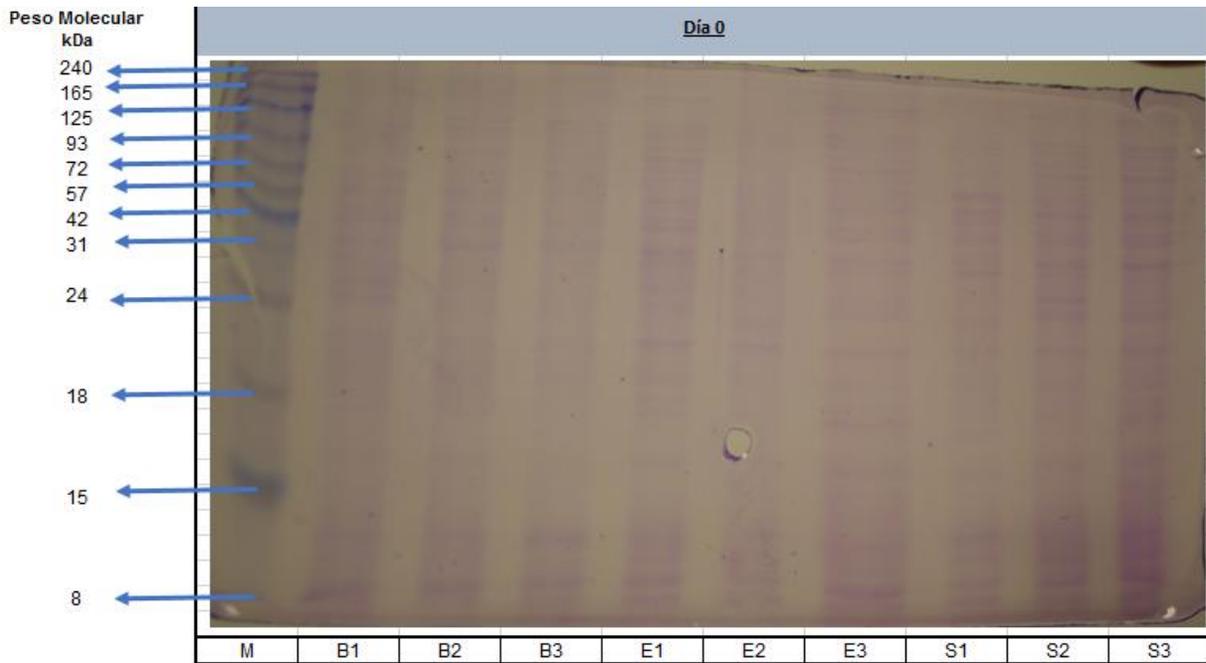


Figura 30. Perfil electroforético de los tres tratamientos en el día 0

Dónde: B – Tratamiento 1 (Producto pasteurizado + B2®); E – Tratamiento 2 (Producto pasteurizado) y S – Tratamiento 3 (Producto sin pasteurizar).

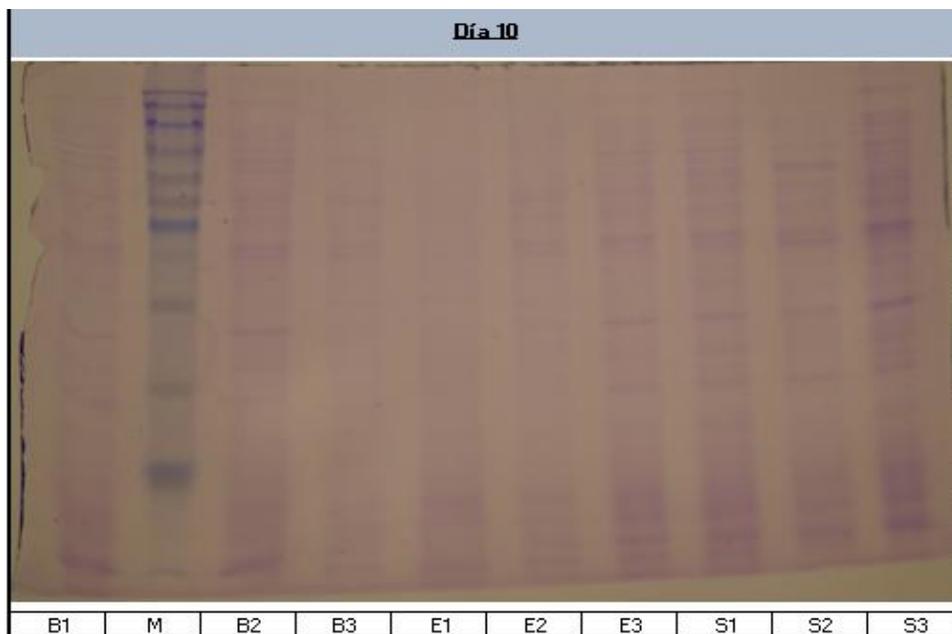


Figura 31. Perfil electroforético de los tres tratamientos en el día 10

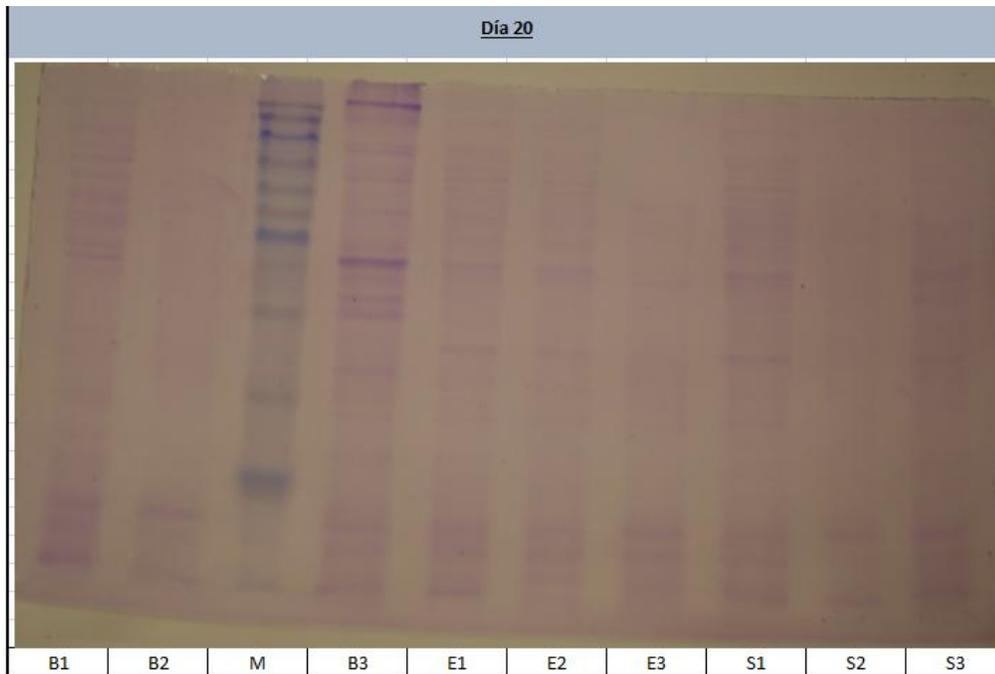


Figura 32. Perfil electroforético de los tres tratamientos en el día 20

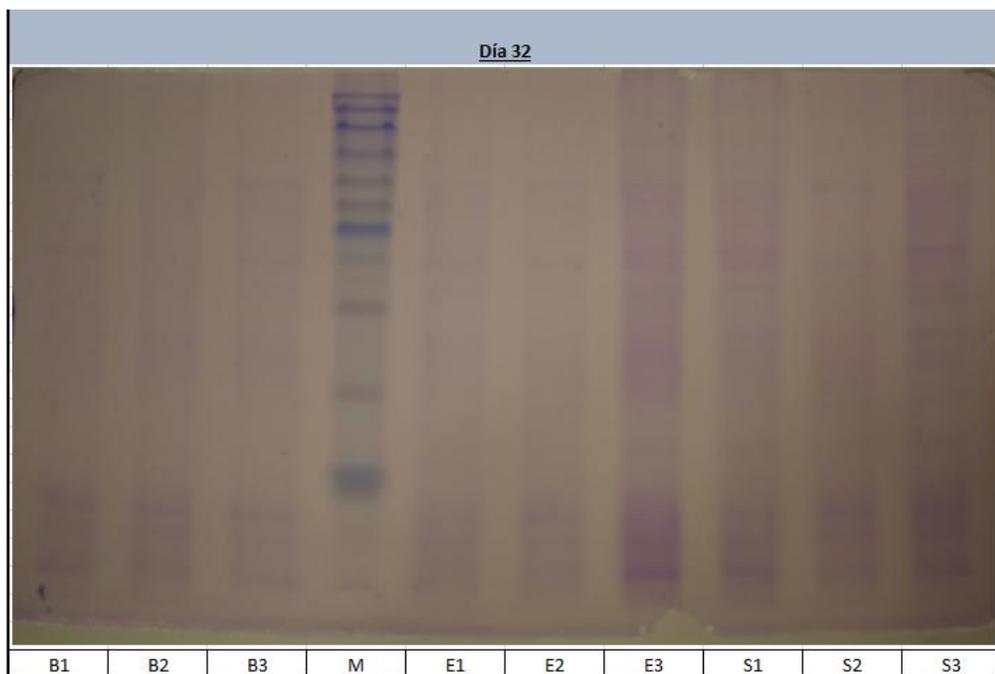


Figura 33. Perfil electroforético de los tres tratamientos en el día 32

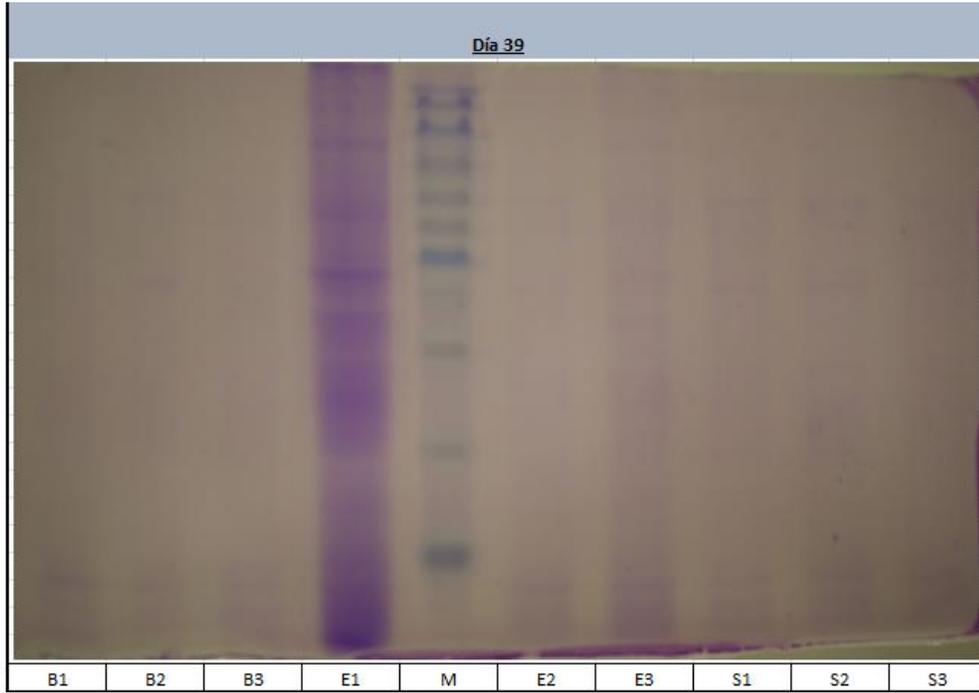


Figura 34. Perfil electroforético de los tres tratamientos en el día 39



Figura 35. Perfil electroforético de los tres tratamientos en el día 50

8.3 FICHA TÉCNICA DE B2®

B-2 SafePro™ Información de Producto

Descripción	<p>Cultivo Cárnico para la bioprotección de productos cárnicos cocidos o curados.</p> <p>B-2 es un cultivo liofilizado de cepa única que contiene <i>Lactobacillus sakei</i>. <i>L. sakei</i> tiene la capacidad de inhibir el desarrollo de bacterias perjudiciales y patógenas, tales como las bacterias ácido lácticas indígenas y la <i>Listeria monocytogenes</i>. <i>L. sakei</i> se desarrolla dentro de un amplio rango de temperatura inferior a 2°C (35°F) y sobrevive al congelamiento.</p>				
Aplicación	<p>Se recomienda el uso de B-2 para la bioprotección de productos cárnicos cocidos o curados envasados al vacío o en atmósfera modificada (MAP).</p> <p>El cultivo no produce lactosa y, por ende, si se utilizara lactosa como carga, la formación de ácido sería limitada. El elaborador cuenta con la ventaja de mantener la seguridad y la calidad sensorial del producto cárnico durante su vida útil.</p>				
Presentación	<table><thead><tr><th>Tamaño del envase</th><th>Código de Producto</th></tr></thead><tbody><tr><td>50 x 25 g para 200 kg</td><td>501116</td></tr></tbody></table>	Tamaño del envase	Código de Producto	50 x 25 g para 200 kg	501116
Tamaño del envase	Código de Producto				
50 x 25 g para 200 kg	501116				
Almacenamiento y vida útil	<p>Los cultivos liofilizados deben almacenarse a una temperatura de -17°C (2°F) para tener una vida útil de al menos 18 meses. A una temperatura de +5°C (41°F), la vida útil es de al menos 6 semanas.</p>				
Dosificación	<p>Siga las instrucciones del sobre.</p>				
Instrucciones de uso	<p>Jamón cocido feteado y embutidos emulsionados: El cultivo se aplica mediante inmersión, goteo o rociando una suspensión del cultivo sobre la superficie luego de la cocción. Por favor, consulte nuestras recetas sugeridas para Jamón Cocido, Salchichas de Viena y Mortadela.</p> <p>Embutidos frescos curados y embutidos untados: El cultivo se agrega directamente al plato de la cutter junto con los ingredientes secos pero también se lo puede aplicar al producto final como se mencionó anteriormente. Por favor, consulte nuestras recetas sugeridas para Chorizo Fresco y embutidos untados.</p> <p>Productos cárnicos crudos curados: El cultivo se agrega directamente a la salmuera que se inyecta en el producto pero también puede aplicarse en el producto final como se mencionó anteriormente. Por favor, consulte nuestras recetas sugeridas para Bacon.</p>				

Información Técnica

Cultivo	B-2
Composición de la cepa bacteriana	<i>Lactobacillus sakei</i>
Temperatura de desarrollo Optima/máxima/mínima	25°C/40°C/2°C (77°F/104°F/35.6°F)
Límite de sal	10% de sal en agua. Tolera mayores niveles de concentración de sal en agua.
Características	Microaerófilo Productor de ácido láctico L(+)
Azúcares fermentables	
Glucosa (dextrosa)	+
Fructosa	+
Maltosa	-
Lactosa	-
Sacarosa (sucrosa)	+
Fécula	-
Carga	Glucosa (dextrosa)
Aspecto	Polvo blanco con partículas amarronadas
Presentación	Cultivo liofilizado envasado en sobres de aluminio resistentes al agua y al aire

Servicio Técnico Las instalaciones de Chr. Hansen en todo el mundo y el personal de nuestro Centro de Aplicación y Tecnología están a su disposición para asistirlo y guiarlo en su elección de cultivo, mezclas de especias y seasonings.

Referencias Las referencias y los métodos de análisis se encuentran a su disposición.

La información aquí contenida es, según nuestro conocimiento, verdadera, correcta y presentada de buena fe. Sin embargo, ninguna garantía contra infracción de patentes está implícita o inferida. Esta información es ofrecida solamente para vuestra consideración y verificación.

8.4 CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NaNO₂ EN ppm VS ABSORBANCIA A 540 NM.

