

EFECTO DEL EXTRACTO CRUDO DE BACTERIOCINAS SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS Y SENSORIALES DE SOLOMO REDONDO (*Longissimus dorsi*) EMPACADO AL VACÍO

CRUDE BACTERIOCIN EXTRACT EFFECT ON THE MICROBIOLOGICAL
AND SENSORIAL CHARACTERISTICS OF SOLOMO REDONDO (*Longissimus dorsi*)
VACUUM-PACKAGING

Sandra M. VÁSQUEZ ¹, Héctor SUÁREZ M. ^{1*}, Olga I. MONTOYA C. ²

Recibido: Diciembre 02 de 2008 Aceptado: Junio 13 de 2009

RESUMEN

Se evalúa la aplicación de extracto crudo de bacteriocinas (ECB), producido por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 sobre las características microbiológicas y sensoriales de filetes de solomo redondo (*Longissimus dorsi*) empacado al vacío, durante 31 días de almacenamiento a 3°C. Se realizan análisis microbiológicos, de pH, fuerza de corte, pérdida de peso y análisis sensorial. Los resultados presentan diferencias significativas en conteos de psicotrófilos en el quinto día de almacenamiento, siendo mejor el tratamiento con ECB que el que se sigue con ácido láctico pH 5.74. Los valores de coliformes fecales estuvieron alrededor de 1.5 NMP/g en las muestras de carne con ECB registrando diferencias significativas en todos los días de almacenamiento ($p < 0.05$), y se presenta un efecto bactericida el día 23, disminuyendo los conteos en 1 ciclo log. No se observan diferencias significativas en los conteos de mesófilos ni de coliformes totales. La variación de pH y pérdida de peso presentan diferencias significativas ($p < 0.05$), atribuidas al proceso de maduración y al empaque al vacío. La fuerza de corte disminuye durante el tiempo de almacenamiento sin registrar diferencias significativas entre los tratamientos. En la apariencia, el color y el aroma se observa disminución en el valor de aceptación a medida que avanza el tiempo de almacenamiento, con diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos, alcanzando mejores puntajes el tratamiento con ácido láctico. Los tratamientos aplicados a la carne disminuyeron las cifras en los conteos de microorganismos evaluados, demostrando su efecto antagonico y aumentando la inocuidad de la carne.

Palabras clave: biopreservación, *Longissimus dorsi*, bacteriocinas, *Lactobacillus plantarum* LPBM10, empaque al vacío.

ABSTRACT

The application of crude bacteriocins extract (CBE) produced by *Lactobacillus plantarum* LPBM10 is tested on the microbiological and sensory characteristics of rib filets (*Longissimus dorsi*) vacuum packing for 31 days storage at 3°C. As parameters of meat quality through time microbiology analysis, pH, cutting force, weight loss and sensorial are made. Significant differences are found in psychrotrophic counts in the fifth

1 Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Calle 59A No. 63-20, Bloque 52 tercer piso. Medellín, Colombia.

2 Escuela de Biociencias, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Calle 59A No. 63-20, Bloque 52 tercer piso. Medellín, Colombia.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: hsuarezm@unal.edu.co

day storage, being better the treatment with crude bacteriocin extract. Levels of fecal coliforms persist around 1.5 UFC/g in meat samples with crude bacteriocins extract. Significant difference in every day storage ($p < 0.05$) are observed and a germicide effect presents in the day 23 diminishing the recounts of these microorganisms in 1 cycle log. There are not statistic differences among treatments for mesophilic counts neither total coliforms, but in day 23 the crude extract is able to diminish the recounts in 0.9 cycle's log. Variations of pH and weight loss present significant differences ($p < 0.05$), due to maturation and vacuum packing, while cutting force diminishes during storage time without significant difference among treatments ($p < 0.05$). Appearance, color and aroma diminish the acceptance value as storage time advances presenting statistical differences among treatments reaching better scores the lactic acid treatment. The treatments applied to meat decrease the counts of micro-organisms evaluated showing its antagonistic effect and increasing the meat safety.

Key words: biopreservation, *Longissimus dorsi*, bacteriocin, *Lactobacillus plantarum* LPBM10, vacuum packaging.

INTRODUCCIÓN

Durante el almacenamiento de la carne es posible que se desarrollen diversos tipos de microorganismos que, por un lado, pueden afectar las propiedades nutritivas y causar alteraciones organolépticas indeseables y, por el otro, permitir el desarrollo de agentes patógenos que pueden afectar la salud del consumidor (1). Para evitar estas situaciones se utiliza la *tecnología de barrera*, que combina estratégicamente técnicas tradicionales (temperatura, actividad de agua (A_w), pH, conservantes) y técnicas nuevas (atmósferas modificadas, bacteriocinas), con el fin de establecer una serie de factores selectivos que los microorganismos no puedan superar (2).

Los métodos de conservación de la carne deben inhibir el crecimiento de la flora patógena y alterante, como *Escherichia coli*, *Serratia* y *Pseudomonas* sp. (3). Uno de los métodos más ampliamente usados en este sector, es el empaque al vacío que, en esencia, consiste en la eliminación de aire para controlar el desarrollo de microorganismos, la acción enzimática y la oxidación. En el empaque al vacío se reducen drásticamente las *Pseudomonas* sp y prevalecen los microorganismos tolerantes al CO_2 , como *Brochothrix thermosphacta* y bacterias ácido lácticas (BAL) (4).

La biopreservación consiste en la extensión de la vida útil de los alimentos y el aumento de la seguridad microbiológica usando una microflora natural o controlada y sus productos antibacteriales (1). Para lograrlo se han utilizado métodos como la aplicación de preparaciones de extracto crudo que contenga la bacteriocina sobre el alimento, presentando resultados positivos en diversos trabajos (1, 7, 8, 9).

Las BAL son microorganismos que ayudan a preservar los alimentos mediante la producción de bacteriocinas, ácido láctico y otros metabolitos. Las bacteriocinas son las sustancias antimicrobianas más interesantes producidas por las BAL, que además de ser antagonistas de microorganismos que atacan los alimentos, son degradadas por enzimas proteolíticas presentes en el tracto gastrointestinal y no son tóxicas (5,6).

La utilización conjunta de empaque al vacío y BAL, o de sus productos antimicrobianos en sistemas de biopreservación, es otra alternativa de conservación para la carne, que ofrece diversas condiciones para extender la vida útil y aumentar la seguridad de los alimentos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del ECB producido por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 sobre la vida útil de carne fresca empacada al vacío, usando parámetros microbiológicos, fisicoquímicos y sensoriales como indicadores de calidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

El solomo redondo (*Longissimus dorsi*) se cortó en filetes de 50 g y se sometió a los siguientes tratamientos: extracto crudo de bacteriocinas (ECB) producido por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 (con 23 mg de proteína/mL); ácido láctico a pH 5.74 y control (agua estéril). Cada tratamiento fue aplicado por triplicado, adicionando un mL en cada una de las muestras de carne y empacado en bolsas de polietileno de baja densidad, marca Cryovac®, con barrera de transmisión de oxígeno de 29-45 mL/ O_2 /m²/24h/atm medido a $\pm 23^\circ C$, y barrera de permeabilidad a gases de 10 – 15 g/m²/24h me-

dido a 38°C, utilizando una empacadora al vacío WEBOMATIC 82246 (Alemania). Las muestras fueron almacenadas en cava de refrigeración a $\pm 3^\circ\text{C}$. Los muestreos se realizaron los días 1, 5, 10, 15, 23 y 31.

Producción del extracto crudo de bacteriocina a partir de *L. plantarum* LPBM10

La cepa nativa de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 fue suministrada por el Laboratorio de Microbiología Industrial de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Un inóculo inicial de 10^6 UFC/mL del *Lactobacillus plantarum* LPBM10 fue cultivado en caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe) a 30°C por 36 horas a 150 rpm en un agitador horizontal (Incubator Shaker, Innova™ 4400, 2000, New Brunswick Scientific co. Inc, NJ, USA). Posteriormente fue centrifugado a 4°C y 10000 rpm durante veinte min (10). El sobrenadante fue esterilizado por filtración por membrana (Milipore, poro $0.45\ \mu\text{m}$ /diámetro 47 mm) y, posteriormente, calentado en estufa a 80°C, conservando esta temperatura en baño maría durante 10 min. Finalmente, el sobrenadante libre de células, o extracto crudo de bacteriocinas, fue neutralizado con NaOH 0.1 N (11, 12). Se determinó la actividad del extracto sobre *Escherichia coli*, por el método de difusión por disco (8). La cantidad de proteína que contenía el extracto crudo fue medida por el método de Bradford.

Análisis microbiológicos de la carne

Se hicieron conteos para mesófilos viables (CVM), psicrótrófilos (CVP), NMP/g de coliformes totales y fecales, presencia o ausencia de *Salmonella*, conteo de esporas sulfito-reductoras y de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva. Los resultados microbiológicos fueron reportados en Unidades Formadoras de Colonias (UFC/g) y Número Más Probable (NMP/g) y transformados en logaritmo.

Determinación de pH

Se obtuvo por lecturas directas en tres partes diferentes de la carne usando un electrodo de 6 mm (Crison, Barcelona).

Medición de pérdida de peso

Se determinó modificando la ecuación propuesta por Roth *et al* (13), determinando el peso inicial y final mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Pérdida de agua} = \frac{\text{Peso inicial filete} - \text{Peso final filete}}{\text{Peso inicial filete}} \times 100$$

Medición de la fuerza de cizallamiento

Fue utilizado el texturómetro STABLE MICRO SYSTEMS (SMS).TAXIT2. Las muestras fueron cocinadas durante 3 min utilizando un horno microondas Panasonic micro/cuarzo dorador modelo NN – G658. Los datos fueron expresados como la fuerza máxima de corte (g) empleando una célula de corte Warner Bratzler, en dirección perpendicular a la fibra. Fueron tomadas 8 mediciones en cada trozo de carne (14, 15 y 16).

Evaluación sensorial

Se consiguió con el método tradicional de juzgar la calidad de la carne. Se evaluaron las características sensoriales de apariencia, color y aroma por cinco panelistas entrenados, utilizando una escala hedónica de nueve puntos, siendo los extremos 9 “me gustó en extremo” y 1 “me disgustó en extremo”. El valor sensorial de 4 fue tomado como el valor mínimo de aceptabilidad (16, 17).

Análisis estadístico

Todos los tratamientos se efectuaron por triplicado. El efecto de los diferentes tratamientos sobre los trozos de carne empacados al vacío y refrigerados a $3 \pm 0.5^\circ\text{C}$, fue evaluado por análisis de varianza (ANOVA). La diferencia entre la media de los diferentes tratamientos y período de almacenamiento, fue determinada por la prueba de mínima diferencia significativa (LSD), y aceptada como diferencia significativa $p < 0.05$. Fue utilizado el software SYSTAT VERSION 7.0 COPYRIGHT (C) 1997, SPSS INC.

RESULTADOS

En los ensayos de actividad mediante la prueba de difusión en discos, del extracto crudo de bacteriocina producido por *Lactobacillus plantarum* LPBM10, fue observada inhibición frente a *E. coli* encontrando halos de 2 mm de diámetro.

Análisis microbiológicos

Los resultados de los conteos de microorganismos en los cortes de solomo redondo (*Longissimus dorsi*), se presentan en la figura 1.

El CVM inicial fue de 4.7 log UFC/g, valor que muestra adecuadas condiciones microbiológicas. No se encontró diferencia significativa entre tratamientos, pero sí entre los días 10 y 15 del periodo de almacenamiento de los tratamientos con ácido

láctico y extracto crudo de bacteriocina con respecto al control. En estos días el control alcanzó valores de 6 y 6.15 log UFC/g, en tanto en los tratamientos con ácido láctico y extracto crudo de bacteriocina los niveles no superaron los 5.5 log UFC/g. En todos los tiempos de almacenamiento, la flora mesófila aumentó a lo largo del tiempo, excepto el día 5, cuando el extracto crudo de bacteriocina consiguió disminuir en 0.22 ciclos log los microorganismos viables pasando de 4.7 a 4.48 log UFC/g, revelando actividad bactericida. Los mayores conteos de mesófilos se registran en las muestras control hasta el día 15, cuando se observa una caída marcada de

los mesófilos en los filetes de carne, alcanzando niveles similares al ácido láctico y al extracto crudo de bacteriocina (cerca de 5.5 log UFC/g).

Al final del período de almacenamiento, los conteos de mesófilos en las muestras de carne fueron 6.3 log UFC/g, 6.28 log UFC/g y 6.15 log UFC/g para el tratamiento con ácido láctico, extracto crudo de bacteriocinas y control respectivamente. En ninguno de los casos se alcanzaron valores de deterioro de la carne (los valores de deterioro de las carnes son 10^7 para detección de malos olores y 10^8 para presencia de limosidad (3).

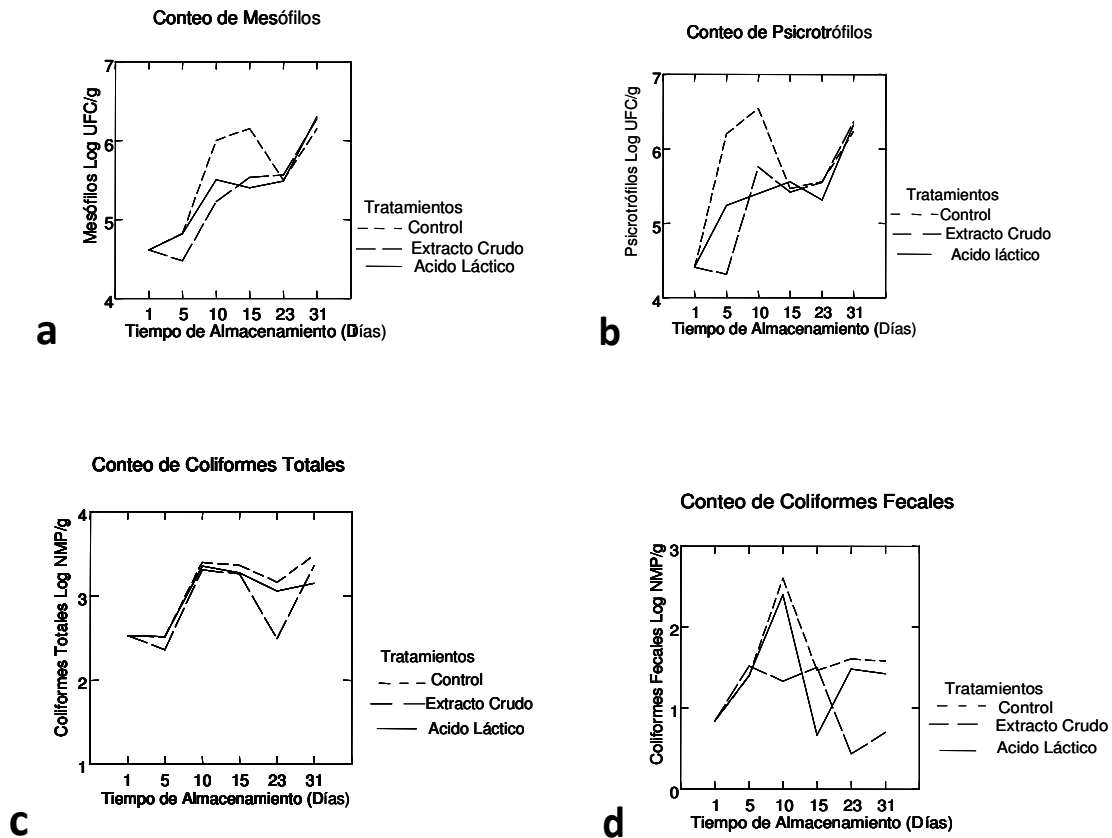


Figura 1. Cambios en la microbiología de filetes de solomo redondo (*Longissimus dorsi*), durante 31 días de almacenamiento al vacío con ácido láctico, extracto crudo de bacteriocinas y control. CVM (1a), CVP (1b), NMP/g de coliformes totales (1c) NMP/g de coliformes fecales (1d).

El CVP inició en 4.41 log UFC/g, presentando diferencias significativas entre tratamientos el día 5 de almacenamiento ($p < 0.05$), donde el solomo tratado con ECB mostró una disminución en el conteo de microorganismos psicotrófilos de 0.09 ciclos log UFC/g, mientras que los cortes de solomo tratados con ácido láctico y el solomo control aumentaron estos conteos en 0.83 y 1.79 ciclos log

respectivamente. Durante el período restante las diferencias no fueron significativas. En el día 15 de almacenamiento se observó una disminución de 1.08 ciclos log UFC/g en la población de psicotrófilos de las muestras control.

Al final del período de almacenamiento, el conteo de psicotrófilos alcanzó niveles de 6.32, 6.37 y 6.24 log UFC/g para ácido láctico, extracto

crudo de bacteriocinas y control respectivamente, sin alcanzar en ningún caso valores de deterioro superiores a 10^7 (3).

El NMP de coliformes totales inició con un conteo de 2.53 log NMP/g, incrementando estos valores a lo largo del tiempo, pero sin que se registrara diferencia significativa entre tratamientos ($p > 0.05$); solamente el día 23 se registró una diferencia significativa en los cortes de solomo tratados con ECB, disminuyendo los conteos en 0.77 ciclos log NMP/g, en comparación con los cortes de solomo tratados con ácido láctico y control, que mantuvieron valores de 3.06 y 3.16 log NMP/g respectivamente. Entre los días 10 y 15 no se observó diferencia significativa en el NMP de coliformes totales para los tratamientos. Al final del periodo de almacenamiento, los coliformes totales alcanzaron valores de 3.15, 3.36 y 3.48 log NMP/g para ácido láctico, ECB y control respectivamente, sin presentar diferencia significativa ($p > 0.05$) (Véase figura 1c).

El NMP inicial para coliformes fecales fue de 0.84 log NMP/g, lo que revela baja contaminación inicial durante la manipulación de las canales y en la obtención de los filetes de carne. Sin embargo, se registró diferencia significativa entre los tratamientos a partir del día 10 ($p < 0.05$). Los niveles máximos de coliformes fecales en las muestras de carne para el día 10 de almacenamiento fueron de 2.4 y 2.6 log NMP/g en los tratamientos con ácido láctico y control respectivamente, mientras que en este periodo, los cortes de solomo tratados con ECB disminuyeron los conteos a 1.33 log NMP/g. El día 15 de almacenamiento el tratamiento con ácido láctico disminuyó el conteo de coliformes fecales

en 1.74 ciclos log NMP/g. Este mismo efecto se observa en el tratamiento control, disminuyendo en 1.14 ciclos log NMP/g, mostrando mayor eficacia con el tratamiento de ácido láctico. Por su parte, el ECB muestra un efecto bacteriostático y bactericida, mantiene conteos menores de 1.5 log NMP/g en todo el periodo de almacenamiento, y se observa el mejor comportamiento de conservación. Para el día 23 se presenta una disminución en 1.07 ciclos log NMP/g por parte del ECB. Al final del periodo de almacenamiento, los conteos de coliformes fecales continúan siendo menores en el tratamiento con ECB (0.70 log NMP/g), comparado con ácido láctico (1.42 log NMP/g) y control (1.58 log NMP/g) (Véase figura 1d).

Durante todo el tiempo de almacenamiento no se detectó crecimiento de *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* ni de esporas sulfito-reductoras.

Análisis de pH

Las variaciones de pH muestran diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$) iniciando con valores de 5.65, 5.69 y 5.74 para ácido láctico, extracto crudo de bacteriocinas y control, respectivamente, después de aplicados los tratamientos (Véase tabla 1).

El día 5 de almacenamiento se registraron menores valores de pH en el tratamiento con ácido láctico (5.47), siendo estadísticamente diferentes a los encontrados en el solomo tratado con ECB (5.61) y el control (5.65) ($p < 0.05$); sin embargo, después del día 10 no se observaron diferencias significativas en los valores de pH entre los tratamientos con ECB y ácido láctico.

Tabla 1. Cambios en los valores de pH en los cortes de solomo redondo (*Longissimus dorsi*), durante 31 días de almacenamiento con ácido láctico, ECB y control.

Tiempo (días)	pH					
	1	5	10	15	23	31
A.L	5.65 ± 0.05 ^b	5.47 ± 0.00 ^c	5.43 ± 0.03 ^b	5.53 ± 0.08 ^b	5.67 ± 0.04 ^a	5.76 ± 0.07 ^b
ECB	5.69 ± 0.01 ^b	5.61 ± 0.03 ^b	5.54 ± 0.10 ^b	5.56 ± 0.03 ^b	5.66 ± 0.01 ^a	5.76 ± 0.07 ^b
Control	5.74 ± 0.03 ^a	5.65 ± 0.02 ^a	5.63 ± 0.05 ^a	5.65 ± 0.05 ^a	5.69 ± 0.04 ^a	5.89 ± 0.11 ^a

^{a,b,c} Valores en la misma columna seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Los valores son expresados como Media ± DS (n = 3).

Los menores valores de pH se obtuvieron el día 10 de almacenamiento, disminuyendo a 5.43, 5.54 y 5.63 con ácido láctico, ECB y control respectivamente; a partir de ese día, el pH presenta diferencias

estadísticas en el control, pero no entre los tratamientos con ECB y ácido láctico. Al final del periodo de almacenamiento se registran valores de pH 5.76 con ácido láctico y ECB y 5.89 para el control.

Análisis de fuerza de cizallamiento o fuerza de corte

Durante el período de almacenamiento los valores de fuerza de corte en los filetes de carne no mostraron diferencia significativa en los tratamientos en ninguno de los días de almacenamiento ($p > 0.05$) (Véase tabla 2).

Tabla 2. Cambios en la textura en los cortes de solomo redondo (*Longissimus dorsi*), durante 31 días de almacenamiento con A.L, ECB y control (g).

Fuerza de corte (g)						
Tiempo (días)	1	5	10	15	23	31
A.L	3849.6 ± 192 ^a	3096.9 ± 97 ^a	2119.8 ± 120 ^a	2050.3 ± 117 ^a	1855.7 ± 106 ^a	1710.3 ± 171 ^a
ECB	3712.1 ± 117 ^a	3119.5 ± 223 ^a	2223.4 ± 219 ^a	2017.2 ± 168 ^a	1894.8 ± 164 ^a	1723.7 ± 98 ^a
Control	3737.1 ± 145 ^a	3006.2 ± 132 ^a	2264.8 ± 170 ^a	2057.2 ± 191 ^a	1933.3 ± 204 ^a	1740.8 ± 150 ^a

^{a,b,c} Valores en la misma columna seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Los valores son expresados como Media ± DS (n = 8).

La degradación de la fibra muscular, relacionada directamente con la terneza de la carne y determinada en esta investigación como la resistencia a la fuerza de cizallamiento, fue más notoria en los primeros 10 días de almacenamiento, iniciando con valores de 3712.09 g y disminuyendo para el día 10 a 2119.76 g; 2223.39 g y 2264.76 g con ácido láctico, ECB y control respectivamente. Al final del período de almacenamiento, la fuerza de corte alcanzó valores de 1710.26 g con ácido láctico, 1723.70 g con ECB y 1740.8 g para el control.

Análisis de pérdida de peso

En los resultados del porcentaje de pérdida de peso durante 31 días de almacenamiento, se observan diferencias significativas entre tratamientos y en los días de muestreo, exceptuando el día 10 ($p < 0.05$) (Véase tabla 3).

Las variaciones en los porcentajes de pérdida de peso no muestran una tendencia definida en el tiempo: en algunos casos las pérdidas son mayores en el control (días 5 y 23), en otros, en los cortes de carne tratados con ácido láctico (día 15), y al final del período de almacenamiento, con el extracto crudo de bacteriocinas.

Tabla 3. Pérdida de peso en los cortes de solomo redondo (*Longissimus dorsi*), durante 31 días de almacenamiento con ácido láctico, ECB y control.

Pérdida de peso (g)					
Tiempo (días)	5	10	15	23	31
A.L	3.53 ± 0.03 ^b	4.28 ± 0.03 ^a	7.18 ± 0.21 ^a	7.22 ± 0.37 ^b	6.17 ± 0.29 ^b
ECB	3.53 ± 0.06 ^b	4.21 ± 0.22 ^a	6.38 ± 0.30 ^b	7.05 ± 0.09 ^b	7.39 ± 0.04 ^a
Control	4.68 ± 0.10 ^a	4.16 ± 0.21 ^a	5.83 ± 0.11 ^c	7.90 ± 0.11 ^a	7.07 ± 0.13 ^a

^{a,b,c} Valores en la misma columna seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Los valores son expresados como Media ± DS (n = 3).

La mayor pérdida de jugos, relacionada directamente con la pérdida de peso de los filetes de carne, es más notoria el día 23 de almacenamiento, cuando fueron determinadas pérdidas entre 7 y 8% del peso inicial; sin embargo, no se encontró diferencia estadística entre ácido láctico y control. Posteriormente, para el día 31, hay diferencia significativa ($p < 0.05$)

en los filetes tratados con ácido láctico con respecto a los otros dos tratamientos.

Análisis sensorial

La figura 2 muestra los resultados del análisis sensorial realizado a las muestras de carne durante los 31 días de almacenamiento. Para los resultados

de apariencia se registraron diferencias significativas en el tratamiento con ácido láctico con respecto al ECB y el control los días 23 y 31 de almacenamiento. El tratamiento con ácido láctico obtuvo

un puntaje de 7 en la escala hedónica, superior a los reportados para cortes de carne con extracto crudo de bacteriocinas y control (valores de 5 y 6 respectivamente) (Véase figura 2a).

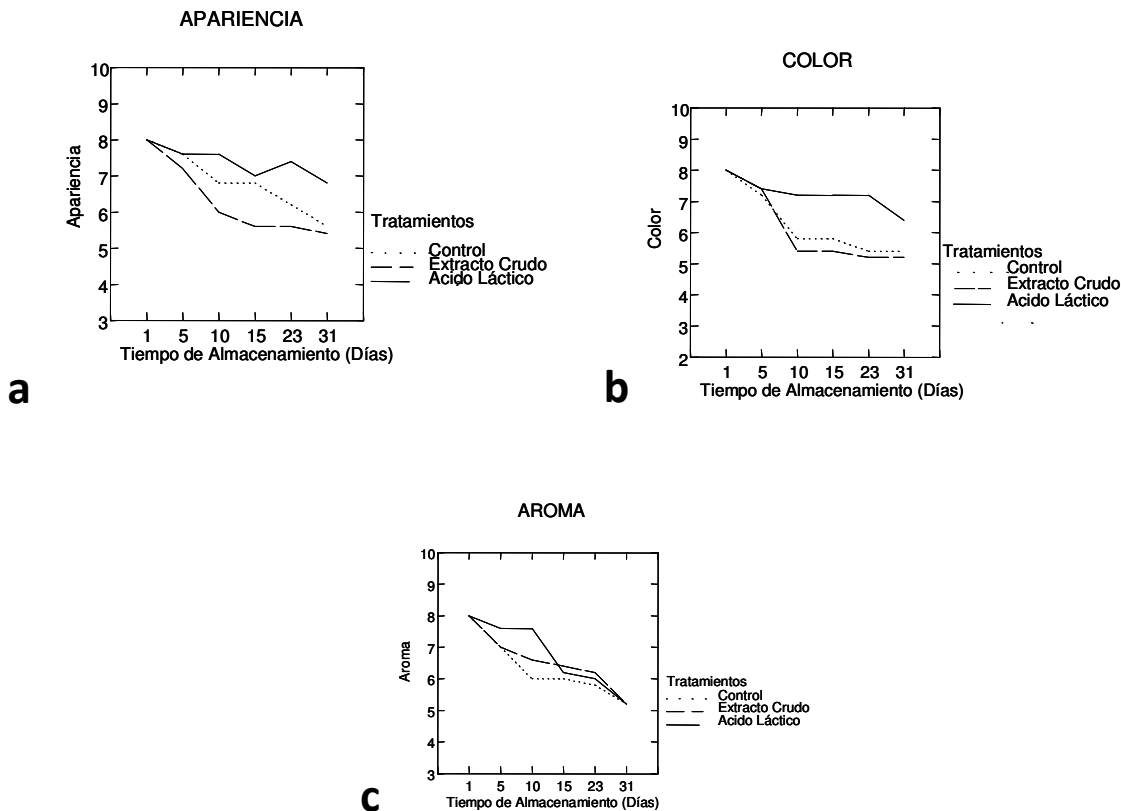


Figura 2. Cambios sensoriales en filetes de solomo redondo (*Longissimus dorsi*), durante 31 días de almacenamiento con ácido láctico, ECB y control. Cambios en la apariencia (a), cambios en el color (b) cambios en el aroma (c).

El atributo color registró variaciones estadísticamente significativas entre tratamientos, el día 23, siendo nuevamente el tratamiento con ácido láctico el mejor calificado por el panel con valores de 7 con respecto al ECB (valor de 5) y al control (valor de 5) (Véase figura 2b).

El aroma decreció rápidamente en los tratamientos con ECB y control mostrando el día 10 de almacenamiento valores de 7 y 6 respectivamente, mientras que con ácido láctico obtuvo en este día puntajes de 8. El ácido láctico alcanzó los mejores puntajes con diferencia estadística en los tres atributos evaluados para los cortes de carne; sin embargo, a pesar de que todas las características sensoriales evaluadas disminuyeron durante el tiempo de almacenamiento, ningún tratamiento alcanzó el valor límite de aceptación (4 en la escala hedónica), los atributos fueron calificados por encima de este

valor en todos los tratamientos incluido el control, lo cual indica el efecto de conservación ejercido por el empaque al vacío sobre las características sensoriales de la carne (Véase figura 2c).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Análisis microbiológicos

Durante el proceso de maduración, la carne sufre cambios microbiológicos que, dependiendo del tipo de microorganismo desarrollado y el manejo durante el almacenamiento, la convierte en un producto con mayor valor agregado, o deteriorado y rechazado por el consumidor. El empaque al vacío inhibe el crecimiento de la flora aerobia de especies gram negativas (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*), y la flora dominante de la carne la componen especies de *Lactobacillus*, *Carnobacterium* y *Leuconostoc*,

que pueden alcanzar conteos de 10^7 - 10^8 /g (3, 4). En esta investigación se observó que, en todos los casos, en la carne empacada al vacío durante 31 días de almacenamiento a $\pm 3^\circ\text{C}$, se registraron conteos de mesófilos, psicrotófilos, coliformes fecales y totales, sin alcanzar niveles de deterioro. Estos resultados son corroborados por otros autores (18) que afirman que el envasado al vacío aumenta la vida útil de la carne fresca entre 21 y 28 días, y concuerdan con los resultados del aroma en el análisis sensorial, pues ninguno de los tratamientos alcanzó el límite mínimo de aceptación, establecido en un valor de 4 (Véase figura 2).

Los resultados en coliformes fecales, similares a los reportados en otras investigaciones, permiten observar la acción de las bacteriocinas sobre bacterias gram negativas (11). Por otro lado, es posible que exista un efecto sinérgico entre el empaque al vacío, la refrigeración y los tratamientos de ácido láctico y ECB, que influyeran en el desarrollo de microorganismos mesófilos y psicrotófilos, debido a que estas condiciones favorecen el desarrollo de CO_2 , causando desestabilización de la membrana citoplasmática de los microorganismos, y permiten la acción de los tratamientos de manera más efectiva.

El efecto bacteriostático o bactericida frente a diferentes microorganismos muestra variaciones que podrían explicarse por la interferencia en la matriz alimentaria de compuestos como grasa y enzimas proteolíticas (17). Varios autores (1, 19) coinciden en afirmar que el uso de bacteriocinas en carne y productos cárnicos puede ser afectado por las características intrínsecas de estos productos e influir en la actividad de la bacteriocina. En este sentido, ha sido demostrado que las bacteriocinas pueden ser inactivadas por su adsorción a la carne y a las partículas lipídicas, o pueden ser destruidas por las proteasas endógenas.

No fue observada inhibición completa de los microorganismos evaluados durante los 31 días de almacenamiento. En este aspecto, otros autores (20, 21) mencionan que la inhibición de microorganismos viables, seguida de la proliferación de los sobrevivientes, sugiere la aparición de células resistentes en la población. Así mismo es posible que la cantidad de bacteriocina en el ECB no fuera suficiente para inhibir por completo los microorganismos evaluados en esta investigación, pues se evaluó la actividad del extracto crudo producido *in vitro*, pero no se determinó la actividad mínima inhibitoria para cada uno de los microorganismos

evaluados. Al respecto algunos trabajos (22) encontraron que la eficacia de las bacteriocinas sobre un microorganismo depende del número de microorganismos existentes a inhibir y de la concentración de la bacteriocina. Además, no siempre unas buenas condiciones de crecimiento del microorganismo significan una buena producción de bacteriocinas; así mismo, no siempre que una bacteriocina es activa *in vitro*, puede asegurarse que tenga antagonismo microbiano sobre la matriz alimentaria (23).

Por otro lado, en la carne refrigerada, la competencia por un sustrato que limite su crecimiento, como la glucosa o el oxígeno, y la interacción que se produce entre las especies, también puede causar variación en la cantidad y tipo de microorganismos que se desarrollan (1), lo que podría explicar los decrecimientos espontáneos de los microorganismos en algunos momentos.

Algunos autores (24, 25) sugieren que la acción de ciertas bacteriocinas también puede verse afectada por la refrigeración, y aseguran que para un proceso eficaz de bioconservación de productos alimenticios refrigerados, el organismo bioprotector debe crecer, producir sustancias antimicrobianas y tener características psicrotófilas. Sin embargo, las temperaturas de refrigeración utilizadas en este estudio ya habían sido evaluadas por otros autores (8), quienes encontraron que el ECB producido por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 tenía actividad frente a *E.coli*, *Listeria* y *Salmonella* entre 0 y 4°C . Esta característica psicrotófila convierte al ECB en una sustancia antimicrobiana potencialmente útil para controlar el desarrollo de microorganismos en productos refrigerados.

Finalmente, las bacterias ácido-lácticas usadas en la carne deben ser aisladas de un producto cárnico y no de otros alimentos, porque están mejor adaptadas y tienen una ventaja competitiva en comparación con bacterias lácticas de otros orígenes (7). Al respecto se debe tener en cuenta que el *Lactobacillus plantarum* LPBM10 fue aislado de vegetales fermentados, lo que pudo afectar el efecto bactericida del extracto al ser usado en carne.

Análisis de pH

Las disminuciones en los valores de pH al inicio del almacenamiento pueden ser consecuencia de los componentes de cada tratamiento. Posteriormente se observan cambios por efecto del empaque al vacío, que favorece el desarrollo de BAL, que mantiene los valores de pH por debajo de 6.0; incluso al final

del período de almacenamiento, estos valores de pH bajo evitan el desarrollo de microbiota deteriorante. Algunos autores (7) confirman que, en condiciones normales, los valores de pH mayores de 6 son alcanzados desde el día 6, y en tratamientos con ácidos orgánicos, a partir del día 9, y que, en consecuencia hay deterioro de las carnes. De otro lado, a pesar del efecto de las BAL en las disminuciones del pH, las variaciones que se presentaron dentro de un mismo tratamiento a lo largo del tiempo fueron de pequeña magnitud, efecto que puede ser atribuido a la capacidad amortiguadora de la carne y a la degradación de las proteínas cárnicas, que se encargaría de la generación de compuestos básicos neutralizando parcialmente el ácido producido y evitando una excesiva acidificación de la carne (26).

Análisis de la fuerza de cizallamiento o fuerza de corte

Algunos autores (27), que también observaron resultados similares a la disminución de la fuerza de corte, encontraron que el mayor ablandamiento de la carne en el músculo *Longissimus dorsi* es producido en los primeros doce días de conservación al vacío. El ablandamiento de la carne durante el período de almacenamiento se atribuye a la acción de las enzimas proteolíticas, como calpainas y catepsinas. Generalmente, su terneza se ve afectada por dos factores: el tejido conectivo y la degradación de las fibras musculares (14). Teniendo en cuenta que el músculo *Longissimus dorsi* tiene baja cantidad de colágeno (15), cabe pensar que la disminución de la fuerza de corte en este estudio está asociada con la degradación de las proteínas miofibrilares.

Análisis de pérdida de peso

La pérdida de peso en los períodos iniciales puede estar asociada con la presión que ejerce el empaque al vacío sobre las fibras musculares de la carne. En los siguientes días de almacenamiento, la pérdida de peso podría considerarse un efecto indirecto de la disminución del pH durante el almacenamiento o de su maduración. Existen tres factores principales que intervienen en la contracción y relajación de las miofibrillas: la aparición del *rigor mortis*, el grado de disminución del pH y la fragmentación de las proteínas del músculo; un pH intracelular bajo puede causar contracción miofibrilar y, como consecuencia, pérdida de los jugos (14). Estas afirmaciones coinciden con los resultados registrados en las muestras de carne

entre los días 10 y 15 (véase tabla 1), donde el pH no supera valores de 5.6 en ninguno de los tratamientos. Contrariamente, el día 31 las pérdidas de peso son bajas en los tres tratamientos, lo que se atribuye a una mayor capacidad de retención de agua del músculo. Al respecto, algunas investigaciones argumentan que durante la maduración se presentan cambios en la permeabilidad de las membranas y debilitamiento de las fuerzas que aproximan las proteínas como consecuencia de la degradación miofibrilar, lo que permite la salida y entrada de las moléculas de agua en diferentes proporciones a la red miofibrilar (28). Durante el proceso de maduración de la carne se da normalmente un aumento de la capacidad de retención de humedad, asociado a la reorganización intramolecular de las proteínas, determinando cambios en la carga eléctrica y aumento de la presión osmótica en el músculo (3), lo que coincide con los resultados obtenidos el día 31 de almacenamiento.

Análisis sensorial

Los valores reportados por el panel sensorial están relacionados con los conteos de microorganismos psicrotrófilos y mesófilos, donde el máximo nivel alcanzado fue de 6.5 log UFC/g, y en él no fueron percibidos aún olores pútridos fuertes, de las carnes, y por ello la calificación es superior al límite de aceptación. En esta investigación la flora desarrollada en las muestras de solomo redondo estuvo controlada y no alcanzó valores elevados que afectaran las características sensoriales, lo que resulta acorde con lo reportado por otros investigadores, que indican que en la carne envasada al vacío y conservada entre 0 y 5°C, las bacterias lácticas, predominantes en estas condiciones, no producen olores ni sabores desagradables porque, debido al bajo contenido de hidratos de carbono y a la fuerte capacidad amortiguadora de la carne, no ejercen un cambio drástico en sus características sensoriales.

Además, eliminan las pseudomonas, responsables de malos olores en la carne fresca, lo que explica además que la carne, a pesar de estar almacenada hasta 31 días, haya obtenido un buen puntaje en el atributo aroma (1, 18, 29).

Los cambios en el color de la carne con ECB fueron atribuidos por el panel sensorial al oscurecimiento que puede obedecer al color del medio MRS donde fue cultivado el *Lactobacillus plantarum* LPBM10. Es posible que, con el paso del tiempo, los componentes del MRS hubiesen reaccionado con

la matriz cárnica, presentando un oscurecimiento mayor que en otros cortes de carne. Resultados similares en el oscurecimiento de la carne son reportados en otros trabajos en carne marinada con 0.5g/100g de *S. aspratus* (enzima fúngica) debido al color oscuro del extracto (14).

CONCLUSIONES

El extracto crudo de bacteriocinas producido por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 además de mostrar efecto antagónico frente a los microorganismos evaluados, podría ser considerado como alternativa de biopreservación utilizando juntamente otro método de conservación como el empaque al vacío, mostrando un efecto sinérgico que potencializa la acción de los tratamientos aplicados, siendo más eficaz el extracto crudo de bacteriocinas que el ácido láctico, durante el periodo de almacenamiento evaluado en los filetes de carne.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Castellano P, Belfiore C, Fadda S, Vignolo G. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Sci.* 2008; 79 (3): 483-499.
- Leistner L. Microbial stability and safety of healthy meat, poultry and fish products. USA: Blackie Academic and Professional; 1997.
- Urrego M, Cadavid L. Efecto sobre la calidad microbiológica, sensorial y reológica de la aplicación de tres diferentes niveles de ácido láctico en un corte de carne de res (huevo de solomo). Medellín: Universidad Nacional de Colombia; 2005.
- Fontana C, Cocconcetti P, Vignolo G. Direct molecular approach to monitoring bacterial colonization on vacuum-packaged beef. *Appl Environ Microbiol.* 2006; (72): 5618-5622.
- Guerrero I, Mendiola E, Prado A. Inoculation of lactic acid bacteria on meat surfaces as a means of descontamination in semitropical conditions. *Meat Sci.* 1995; (40): 397-411.
- Ganzlec G, Hertela, Vossen M, Hammesa P. Effect of bacteriocin-producing lactobacilli on the survival of *Escherichia coli* and *Listeria* in a dynamic model of the stomach and the small intestine. *Inter J Food Microbiol.* 1999; (48): 21-35.
- Fiorentini M, Sant'Anna S, Porto C, Mazo Z, Franco D. Influence of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* in the shelf-life of refrigerated bovine meat. *Braz J Microbiol.* 2001; (32): 42-46.
- Gutiérrez L, Montoya O, Ruiz S. Evaluación del potencial bactericida de los extractos de bacterias ácido lácticas sobre el crecimiento in vitro de *E. coli*, *Salmonella* sp y *Listeria monocytogenes*. CENIC Ciencias Biológicas. 2005; (36): N° Especial.
- Gómez F. Efecto antimicrobiano de un extracto crudo de bacteriocinas obtenido de *Lactobacillus plantarum* evaluados en un quesito antioqueño contaminado con *Listeria monocytogenes*. Medellín: Universidad Nacional de Colombia; 2005.
- Ogunbanwo S, Sanni A, Onilude A. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *J Biotechnol.* 2003; 2 (8): 219-227.
- Todorov S, Dicks L. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram negative bacteria. *Enzyme Microbial Technol.* 2005; (36): 318-326.
- Feria P. Aislamiento y caracterización de bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 en suero de leche. Medellín: Universidad Nacional de Colombia; 2007.
- Roth B, Slinde E, Arildsen J. Pre or post mortem muscle activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). The effect on rigor mortis and the physical properties of flesh. *Aquaculture.* 2006; 257 (1 - 4): 504-510.
- Gyol K, Min J, Kyoung H, Chul Y, Hoon S, Chul B, et al. Tenderization and fragmentation of myofibrillar proteins in bovine *Longissimus dorsi* muscle using proteolytic extract from *Sarcodon aspratus*. *LWT* 2008; 41 (8): 1389-1395.
- Santrich D. Evaluación de la calidad y composición química de la carne de res proveniente de animales de dos grupos de edad en Puerto Rico. [Tesis de Maestría] Puerto Rico: Universidad de Puerto Rico. Recinto universitario de Mayagüez; 2006.
- Ruiz de Huidobro E, Miguel B, Blázquez E, Onega A. A comparison between two methods (Warner-Bratzler and texture profile analysis) for testing either raw meat or cooked meat. *Meat Sci.* 2005; 69 (3): 527-536.
- Suarez H, de Francisco A, Beirão L. Influencia de bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 sobre la vida útil de filetes del híbrido de Cachama *Piaractus brachyomus* x *Colossoma macropomum* empacado al vacío. *Vitac.* 2008; 15 (1): 32-40.
- García T, Martín R, Sanz B, Hernández P. Extensión de la vida útil de la carne fresca. I Envasado en atmósfera modificada y utilización de bacterias ácido lácticas y bacteriocinas. *Rev Esp Cienc Tecnol Ali.* 1995; 35 (1): 1-18.
- Martinis E, Franco B. Inhibition of foodborne pathogens by bacteriocin producing *Leuconostoc* sp. and *Lactobacillus* sake isolated from linguíça frescal. *Rev Microbiol.* 1997; 28: 284-287.
- Crandall D, Montville T. Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64(1): 231-237.
- Schillinger U, Chung H, Keppler K, Holzapfel W. Use of bacteriocinogenic lactic acid bacteria to inhibit spontaneous nisin-resistant mutants of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J Appl Microbiol.* 1998; 85 (4): 657-663.
- Vignolo G, Fadda S, Kairuz M, Holgado A, Oliver G. Control of *Listeria monocytogenes* in ground beef by lactocina 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL705. *Inter J Food Microbiol.* 1996; 29 (2-3): 397- 402.
- Gálvez A, Abriouel H, Lucas R, Ben N. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Inter J Food Microbiol.* 2007; 120 (1-2): 51-70.
- Lewus C, Montville T. Further characterization of bacteriocins plantaricin BN, Bavaricin MN and Pediocin A. *Food Biotechnol.* 1992; 6 (2): 153-174.
- Memullen L, Stiles M. Potencial for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. *J Food Prot.* 1996 (55 Suppl): 64 -71.
- Sanz Y, Fadda S, Vignolo G, Aristoy M, Oliver O, Toldra F. Hydrolytic action of *Lactobacillus casei* CRL705 on pork muscle sarcoplasmic and myofibrillar proteins. *J Agri Food Chem.* 1999; 47 (8): 3441-3448.
- Eilers J, Tatum J, Morgan J, Smith G. Modification of early postmortem muscle pH and use of postmortem ageing to improve beef tenderness. *J Animal Sci.* 1996; 74 (4): 790-798.
- Olite B, Moreno T, Carballo J, Monserrat L, Sánchez L. Estudio de la calidad de la carne de ternera de raza Rubia Gallega a lo largo de la maduración al vacío. *Arch Zootecnia.* 2006; 55 (209): 3-14.
- Vásquez S, Suárez H, Zapata S. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Rev Chil Nutr.* 2009; 36 (1): 64-71.