



Revista Chilena de Nutrición

ISSN: 0716-1549

sochinut@tie.cl

Sociedad Chilena de Nutrición, Bromatología y
Toxicología
Chile

Vásquez M, Sandra Milena; Suárez M, Héctor; Montoya, Olga Inés
EVALUACIÓN DE BACTERIOCINAS COMO MEDIO PROTECTOR PARA LA BIOPRESERVACIÓN
DE LA CARNE BAJO REFRIGERACIÓN
Revista Chilena de Nutrición, vol. 36, núm. 3, septiembre, 2009, pp. 228-238
Sociedad Chilena de Nutrición, Bromatología y Toxicología
Santiago, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46914639004>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

EVALUACIÓN DE BACTERIOCINAS COMO MEDIO PROTECTOR PARA LA BIOPRESERVACIÓN DE LA CARNE BAJO REFRIGERACIÓN

EVALUATION OF BACTERIOCINES AS PROTECTIVE MEANS FOR THE BIOPRESERVATION OF REFRIGERATED MEAT

Sandra Milena Vásquez M. (1), Héctor Suárez M. (1), Olga Inés Montoya (2)

(1) Departamento de Ingeniería Agrícola y de Alimentos.

Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, Facultad de Ciencias Agropecuarias,

(2) Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Colombia.

ABSTRACT

*The objective was to evaluate shelf-life extension of fresh beef meat applying crude extract of bacteriocines produced by a native strain of *Lactobacillus plantarum* LPBM10. Fillets of rib (*longissimus dorsi*) were stocked during 12 days at 3° C and analyzed by means of microbiology analysis, pH, texture, weight loss and sensorial. Significant differences were found among treatments for psychrotrophics and fecal coliforms, being better the treatment with crude bacteriocin extract that had germicide effect. Fecal coliforms were inhibited by the crude bacteriocin extract during most of the period. The mesophilic count didn't present difference among treatments. The pH changes and the weight loss present statistical variations among treatments and between days. Cutting force diminished during storage time in all treatments improving meat tenderness without presenting significant difference. The appearance, color and aroma diminished the acceptance value as the storage time advanced.*

Key words: meat; biopreservation; bacteriocins; *lactobacillus plantarum*; LPBM10.

Este trabajo fue recibido el 10 de Marzo de 2009 y aceptado para ser publicado el 20 de Junio de 2009.

INTRODUCCIÓN

La carne es un alimento susceptible a ataques de diversos tipos de microorganismos patógenos y alterantes que causan deterioro en periodos relativamente cortos; por ello la industria cárnica tiene la necesidad de diseñar técnicas de conservación que permitan aumentar la vida útil, sin alterar las características fisicoquímicas, sensoriales y el valor nutricional.

Aunque la microbiota inicial de la carne es muy variada, la mayoría de los microorganismos que alteran la carne fresca refrigerada son bacterias psicrotrofas aerobias, anaerobias facultativas y microorganismos gram positivos, (1, 2). Sin embargo, algunas toxiinfecciones alimentarias pueden ser originadas por bacterias mesófilas patógenas presentes en la carne como *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* sp., *Escherichia coli* enterohemorrágica (O 157:H7) y *Listeria monocytogenes* (3), constituyendo un riesgo para la salud, y causando alteraciones de las

características organolépticas de la carne.

La biopreservación es un método de conservación que busca alargar la vida útil de los alimentos usando bacterias ácido lácticas (BAL) y sus metabolitos. Las metodologías de biopreservación mas comúnmente utilizadas en alimentos son la aplicación de cepas productoras de sustancias antagonicas denominadas cepas biopreservantes, la utilización de preparaciones como extracto crudo de bacteriocinas, licor fermentado o concentrados obtenidos mediante el crecimiento de cepas biopreservantes en medios de cultivo específico y la adición de sustancias antagonicas puras o semipuras como las bacteriocinas producidas por BAL (4).

Las BAL son usadas en la biopreservación como cultivos bioprotectores y se han destacado por ser microorganismos que mediante la producción de ácido láctico y otros metabolitos contrarrestan el crecimiento de bacterias no deseadas, ayudando a preservar el alimento. El grupo de bacterias lácticas asociadas con los alimentos incluyen cocos de los géneros: *Lactococcus*, *Streptococ-*

cus, *Pediococcus* y *Leuconostoc*, como también bacilos de los géneros *Lactobacillus* y *Carnobacterium* (5).

Dentro de los metabolitos producidos por las BAL se encuentran las bacteriocinas que son proteínas o péptidos antimicrobianos sintetizados en el ribosoma de las BAL, la célula productora sintetiza una molécula que la inmuniza contra la propia bacteriocina. Estos péptidos atacan la membrana celular de otras bacterias evitando su reproducción (6).

El uso de las BAL y los metabolitos producidas por estas como las bacteriocinas en forma de extractos crudos o purificados, ofrecen un potencial en la conservación de alimentos, siendo una alternativa en la industria de alimentos que podría ayudar a reducir la adición de preservantes químicos y disminuir la intensidad del tratamiento térmico, resultando en alimentos preservados naturalmente, con mejores propiedades nutricionales y organolépticas (7).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de las sustancias antimicrobianas tipo bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10, sobre la vida útil de carne fresca almacenada a 3 °C, usando parámetros microbiológicos, fisicoquímicos y sensoriales como indicadores de calidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fue utilizado el músculo solomo redondo (*Longissimus dorsi*) obtenido por medio de una comercializadora de carnes que suministro los músculos con menos de 24 horas después del sacrificio, se utilizaron 2 músculos partidos en filetes de 50 g, para un total de 54 filetes, aplicando los siguientes tratamientos: Extracto crudo de bacteriocinas producido por *L. plantarum* LPBM10 con 23 mg de proteína como tratamiento 1 (T1); Ácido láctico ajustado a pH 5.74 como tratamiento 2 (T2); Control con agua destilada estéril como tratamiento control (T3). Cada tratamiento fue aplicado por triplicado, adicionando un mL en cada una de las muestras de carne. Las muestras de carne fueron empacadas en bolsas de polietileno de baja densidad y almacenadas a $3 \pm 0,5$ °C, las mediciones fueron realizadas durante los días 0, 3, 5, 8, 10 y 12.

Producción del extracto crudo de bacteriocinas a partir de *L. Plantarum* LPBM10. La cepa nativa de *L. plantarum* LPBM10 fue suministrada por el Laboratorio de Microbiología Industrial de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Un inóculo inicial de 106 UFC/mL del *L. plantarum* LPBM10, fue cultivado en caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe) a 30 °C por 48 horas a 150 rpm en un agitador horizontal (Incubator Shaker, Innova™ 4400, 2000, New Brunswick Scientific co. Inc, NJ, USA), simulando condiciones de anaerobiosis.

Posteriormente centrifugado a 4 °C y 10000 rpm durante 20 minutos (8). El sobrenadante fue esterilizado por filtración por membrana (Milipore, poro 0,45 µm/diámetro 47 mm) y luego fue calentado a 80 °C durante 10 minutos. Finalmente el sobrenadante libre de células o extracto crudo de bacteriocinas fue neutralizado con NaOH 0.1 N (9, 10). La cantidad de proteína producida por el *Lactobacillus plantarum* LPBM10 contenida en el extracto crudo fue medida por el método de Bradford.

Determinación de la actividad del extracto crudo de bacteriocinas. La determinación de la actividad del extracto crudo de bacteriocinas producido por el *Lactobacillus plantarum* LPBM10 fue evaluada sobre *E. coli*, por el método de difusión por disco. El microorganismo fue inoculado sobre cajas de petri con agar nutritivo por el método de superficie, posteriormente, fueron colocados los discos de papel filtro en el medio de cultivo impregnados con 20 µL del extracto crudo de bacteriocinas e incubados a 30 °C durante 24 horas. La actividad antibacteriana fue comprobada por la presencia de halo inhibitorio alrededor de los discos.

Producción del ácido láctico ajustado a pH 5.74

Se utilizó ácido láctico 0.1M con un pH inicial de 2.3 y se ajustó a pH de 5.74 adicionando pequeñas concentraciones de NaOH 0.1 N midiendo con un pHmetro Milwaukee pH/°C tester ph 52.

Análisis microbiológicos de la carne

Se realizaron los siguientes análisis microbiológicos: Conteo Mesófilos Viables (CVM), Conteo de psicotrófilos (CVP), NMP/g de coliformes totales y coliformes fecales, presencia o ausencia de *Salmonellas*, Recuento de Esporas Sulfito Reductoras y Recuento de *Staphylococcus aureus* Coagulasa Positiva, según el Instituto de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA).

Fueron pesados 10 g de la muestra se mezclaron en 90 mL de agua peptonada, luego inoculados de a un mL en Agar Plate Count, se incubaron a 35 ± 2 °C durante 48 horas y a 4 ± 0.5 °C durante 5 días para la determinación de mesófilos y psicotrófilos respectivamente. La determinación de esporas sulfito reductoras se realizó en agar SPS, incubado a 35 ± 2 °C por 72 horas bajo condiciones de anaerobiosis.

Determinación de coliformes totales y fecales: se trabajó con el método del NMP/100 mL, utilizando 9 tubos con Caldo Fluorocult LMX. Se incubaron a 35 ± 20 °C por 24 a 48 horas. Se detectaron los coliformes totales por cambio de color de amarillo a verde azulado y los coliformes fecales por fluorescencia y presencia de indol con el reactivo Kovac's.

Determinación de estafilococo coagulasa (+): Fue inoculado 0.2 mL de las diluciones en el agar Baird Parker, se incubó a 35°C durante 24 a 48 horas.

Determinación de Salmonella: 25 g de muestra se adicionaron a 225 mL de peptona buferada, incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 16 a 24 horas. Posteriormente, un mL de cultivo fue adicionado a 9 mL de caldo tetrationato, incubado a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas.

Los resultados microbiológicos fueron reportados en unidades formadoras de colonia (UFC/g) y número más probable (NMP/g) y transformados en logaritmo.

Evaluación de parámetros físico - químicos

Determinación de pH. Las mediciones se realizaron por lecturas directas dentro de la carne en tres partes diferentes, usando un electrodo de 6-mm (Crison, Barcelona, España).

Medición de pérdida de peso. Fue determinado utilizando una balanza analítica marca Ohaus modificando la ecuación propuesta por Roth et al (11), 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) TAXT2. Las muestras fueron cocinadas durante 3 minutos utilizando un horno microondas. Los datos fueron expresados como la fuerza máxima de corte (g) utilizando una célula de corte Warner Bratzler, en dirección perpendicular a la fibra. Fueron realizadas 8 mediciones en cada trozo de carne (12 - 14)

Evaluación sensorial

El análisis sensorial fue realizado por el método tradicional de juzgar la calidad de la carne. Fueron evaluadas las características sensoriales de apariencia, color y aroma por cinco panelistas entrenados, utilizando una escala hedónica de nueve puntos siendo los extremos 9 “guste extremadamente” y 1 “disguste extremadamente”. El valor sensorial de 4 fue tomado como el rango mínimo de aceptabilidad (14, 15).

Análisis estadístico. Para el estudio del efecto de los tres tratamientos de conservación y el tiempo de almacenamiento sobre atributos de calidad de la carne, fue realizado un diseño factorial con dos factores (tiempo y conservación), empleando tres niveles de conservación (tres tratamientos) y seis niveles de tiempo de almacenamiento (0, 3, 5, 8, 10 y 12 días). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. El efecto de los diferentes tratamientos sobre los trozos de carne empacados en bolsas

y refrigerados a $3 \pm 0.5^\circ\text{C}$, fue evaluado por análisis de variancia (ANOVA), la diferencia entre la media de los diferentes tratamientos y periodo 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 (©) 1997, SPSS INC.

RESULTADOS

Determinación de la actividad del extracto crudo de bacteriocinas

La capacidad antagonista del extracto crudo de bacteriocinas producido a partir del *Lactobacillus plantarum* LPBM10 fue observada en la prueba de difusión por discos, reportando actividad frente a *E. coli* encontrando halos de inhibición de 2 mm de diámetro.

Análisis microbiológicos

La figura 1 muestra los cambios presentados en la microbiota de los cortes de solomo redondo (*Longissimus dorsi*) durante el almacenamiento refrigerado, para los tres tratamientos; ácido láctico extracto crudo de bacteriocinas producido por *L. plantarum* LPBM10, y control. El conteo inicial para Mesófilos fue de 4.7 log UFC/g. No se encontró una diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$), pero sí a lo largo del período de almacenamiento.

Durante el período de almacenamiento los tres tratamientos mostraron variaciones en los recuentos de mesófilos, específicamente en el día 3 donde el tratamiento con extracto crudo de bacteriocina disminuyó el conteo de mesófilos a 4.03 Log UFC/g (0.7 ciclos log) mostrando un efecto bactericida, de forma similar el tratamiento con ácido láctico consiguió disminuir la población el día 5 pasando de 5.28 a 4.78 Log UFC/g (0.5 ciclos log). A partir de allí los niveles de mesófilos suben en todos los tratamientos, alcanzando valores para el final del periodo de almacenamiento de 6.81, 6.88 y 6.94 Log UFC/g para ácido láctico, extracto crudo de bacteriocinas y control respectivamente.

El desarrollo de la flora mesófila es sin embargo menos acelerado en los primeros días de almacenamiento, durante los días 8 y 10 los valores para mesófilos se mantuvieron casi en el mismo nivel para los tres tratamientos, reflejando el efecto del frío como sistema de conservación que ejerce un efecto bacteriostático en estos microorganismos.

De otra parte, los psicotróficos iniciaron con un recuento inicial de 4.3 Log UFC/g presentando diferencia significativa entre tratamientos y en los días 3, 10 y 12 de almacenamiento ($p < 0.05$). El tratamiento con extracto crudo de bacteriocinas mostró tener efecto bactericida en

el día 3 disminuyendo la flora psicrotrofica a 3.66 Log UFC/g, reanudando el crecimiento de estas bacterias durante el periodo restante.

Los recuentos de psicrotófilos en carnes tratadas con ácido láctico y control alcanzaron valores de 7 ciclos log desde el día 10 de almacenamiento, mientras que las carnes con extracto crudo de bacteriocina se mantuvieron en niveles de 6 ciclos log, posteriormente para el final del periodo de almacenamiento se encontraron en las muestras control valores de 8.1 Log UFC/g para este periodo, indicando condiciones avanzadas de deterioro, por su parte las muestras tratadas con ácido láctico y extracto crudo de bacteriocinas, mostraron un desarrollo de psicrotófilos más controlado en este periodo, aunque también alcanzaron recuentos de 7.19 y 7.28 log UFC/g respectivamente.

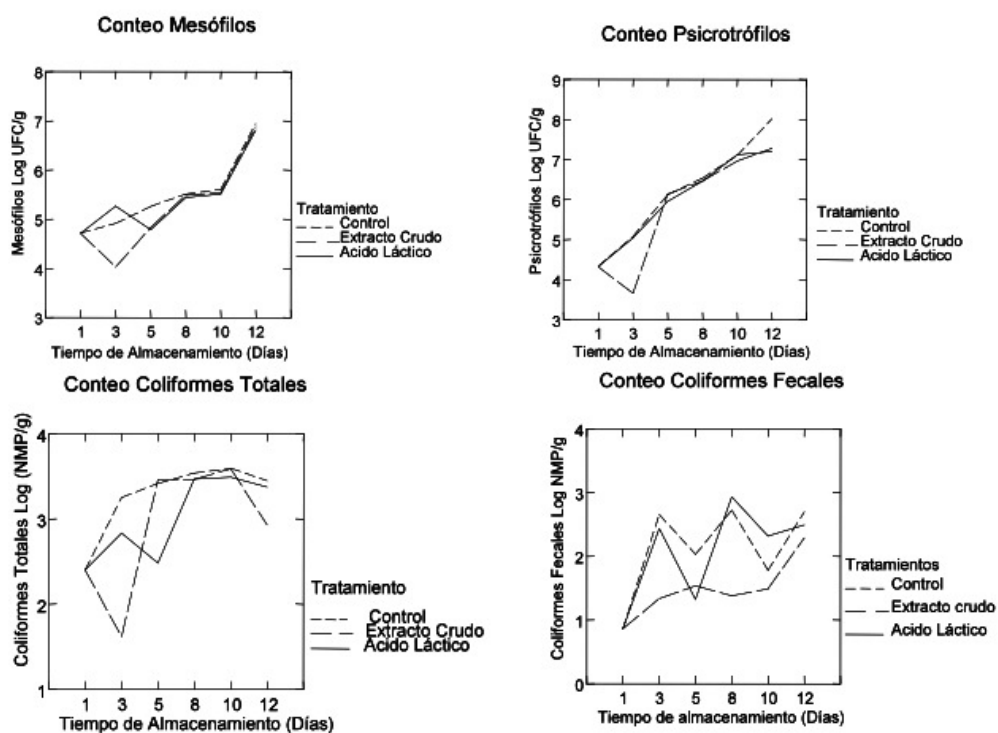
El conteo inicial de coliformes totales fue de 2.32 log NMP/g con diferencias significativas entre tratamientos y en los días 3, 5 y 12 de almacenamiento ($p < 0.05$). Los mejores resultados fueron obtenidos para el tratamiento

con extracto crudo de bacteriocinas, observándose un comportamiento bactericida durante los tres primeros días, disminuyendo los recuentos hasta 1.62 log NMP/g. Este efecto vuelve a presentarse al final del periodo de almacenamiento, donde los niveles se redujeron hasta 2.93 log NMP/g, comparado con el tratamiento de ácido láctico 3.37 log NMP/g y con el control 3.45 log NMP/g. El día 5 el tratamiento con ácido láctico disminuye los niveles en 0.35 ciclos log, pero a partir de allí se comporta similar al control hasta el final del periodo.

El recuento inicial para coliformes fecales fue de 0.95 log NMP/g, y presentó para el final del periodo de almacenamiento valores alrededor de 1.85, 2.29 y 2.70 log UFC/g para ácido láctico, extracto crudo de bacteriocinas y control, respectivamente, con diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$). Igualmente durante el periodo de almacenamiento el desarrollo de estos microorganismos mostró diferencia significativa en los días 3 y 8 ($p < 0.05$). El mejor tratamiento en el control de microorganismos fecales a lo largo del período

FIGURA 1

Cambios microbiológicos en solomo Redondo (*Longissimus dorsi*), durante 12 días de almacenamiento a 30°C tratados con Acido láctico, extracto crudo de bacteriocinas y control.



do fue el extracto crudo de bacteriocinas, que impidió el desarrollo de colonias fecales en niveles superiores a 1.5 log NMP/g durante la mayor parte del periodo. En el día 3 los valores alcanzados fueron 2.44, 1.34 y 2.66 log NMP/g para ácido láctico, extracto crudo de bacteriocinas y control respectivamente, comprobando el efecto bacteriostático del extracto crudo frente a los microorganismos fecales. De forma similar para el día 8 los recuentos fueron 2.73 y 2.93 log NMP/g para ácido láctico y control respectivamente, mientras que el extracto crudo de bacteriocinas sólo permitió el desarrollo de 1.38 log NMP/g.

Fueron detectadas esporas sulfito reductoras solamente en el tratamiento con ácido láctico para el día 3 de almacenamiento. De otra parte no se detectó crecimiento de *Salmonella* durante el período de almacenamiento.

Análisis de pH

La tabla 1 muestra los cambios presentados en el pH de las carnes durante el almacenamiento por 12 días. El valor de pH inicial para los filetes de solomo redondo fue de 5.74, después de aplicados los tratamientos el pH disminuyó a 5.65 y 5.69 para ácido láctico y extracto crudo de bacteriocinas respectivamente, el control se mantuvo en niveles alrededor de 5.76. Entre los días 1 y 5 fue observada una disminución del pH, alcanzando el día 5 valores de 5.53 con ácido láctico, 5.55 con extracto crudo de bacteriocinas y 5.65 para el control. A partir del día 8 el pH empieza a subir nuevamente hasta el día 12 de almacenamiento.

Las variaciones de pH presentaron diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$), encontrando que el tratamiento con ácido láctico mantuvo los niveles mas bajos de pH, posiblemente debido a la composición del tratamiento que aportaba acidez a las muestras de carne. Sin embargo, no se observó una diferencia significativa

en la interacción tratamiento/día, lo que indica que no fueron presentadas grandes variaciones del pH, durante el almacenamiento dentro de un mismo tratamiento, manteniendo valores entre 5.5 y 5.78.

Análisis de textura

Los resultados de textura, no presentaron diferencia significativa entre tratamientos, pero si en la interacción tratamiento/día ($p < 0.05$), indicando que los valores de fuerza al corte de los filetes de carne disminuyeron en todos los tratamientos a través del tiempo (figura 2).

La dureza de la carne fue disminuyendo constantemente hasta el final del periodo de almacenamiento, iniciando con valores de fuerza al corte de 3712.09 g en el día 1 y finalizando en el día 12 de almacenamiento con valores de 2124.68 g, 2114.83 g y 2169.69 g con ácido láctico, extracto crudo de bacteriocinas y control respectivamente. Solamente se presentó una diferencia significativa ($p < 0.05$) en el día 8 con valores de 2638.1 g, 2908.3 g y 2768.9 g para ácido láctico, extracto crudo de bacteriocinas y control respectivamente.

Análisis de pérdida de peso

La pérdida de peso varió durante todo el periodo de almacenamiento, presentando diferencia significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos y en todos los días de almacenamiento, excepto el día 8 (tabla 2).

Las menores pérdidas de peso las obtuvieron las muestras control en los días 3 y 10 ($p < 0.05$), mientras que las muestras de carne tratadas con el extracto crudo de bacteriocinas obtuvieron las menores pérdidas el día 5 ($p < 0.05$). El tratamiento con ácido láctico obtuvo mayores pérdidas de peso en el día 10 de almacenamiento alcanzando valores de 7.6%, comparado con extracto crudo de bacteriocinas y control (7.02% y 6.46% respectivamente).

TABLA 1

Cambios de pH en los cortes de solomo redondo (*Longissimus dorsi*), durante 12 días de almacenamiento con ácido láctico, extracto crudo de bacteriocinas y control.

Tiempo (Días)	1	3	5	8	10	12
Tratamiento						
Acido Láctico	5.65 ± 0.03 ^a	5.57 ± 0.00 ^a	5.53 ± 0.03 ^a	5.54 ± 0.06 ^a	5.62 ± 0.04 ^a	5.68 ± 0.02 ^a
Extracto crudo bact	5.69 ± 0.05 ^a	5.66 ± 0.04 ^b	5.55 ± 0.04 ^a	5.57 ± 0.03 ^a	5.68 ± 0.03 ^b	5.73 ± 0.06 ^a
Control	5.76 ± 0.02 ^b	5.73 ± 0.01 ^c	5.65 ± 0.01 ^b	5.67 ± 0.04 ^b	5.70 ± 0.02 ^b	5.80 ± 0.05 ^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 ± DE (n = 3).

Al final del período de almacenamiento (día 12) las pérdidas de peso son inferiores a las observadas en el día 10 en todos los tratamientos con porcentajes de 4.56 para ácido láctico, 4.38 para extracto crudo de bacteriocinas y 5.33 para el control, sin embargo en este día no hay diferencia entre ácido láctico y extracto crudo de bacteriocinas.

Análisis sensorial

La figura 3 muestra los cambios sensoriales presentados durante el periodo de almacenamiento, observándose que en los primeros días el control obtuvo mejores puntajes en la evaluación sensorial para los atributos de apariencia, color y aroma. Sin embargo, los resultados

del análisis de varianza para cada atributo sensorial no mostraron diferencias significativas entre tratamientos y en ninguno de los días de muestreo ($p>0.05$).

A medida que avanzó el tiempo de almacenamiento, los valores de los atributos evaluados disminuyeron el valor de aceptación. Los filetes de carne tratados con ácido láctico tuvieron mejor aceptación en apariencia y color, pero obtuvieron los menores puntajes en aroma hasta el día 10.

El aroma fue el atributo sensorial más afectado durante el tiempo de almacenamiento, alcanzando el límite máximo de aceptabilidad para el día 12 de almacenamiento en los tres tratamientos. Este desarrollo de aromas desagradables está relacionado con los conteos de mi-

FIGURA 2

Cambios en la textura en los cortes de solomo Redondo (*Longissimus dorsi*), durante 12 días de almacenamiento con ácido láctico, extracto crudo de bacteriocinas y control.

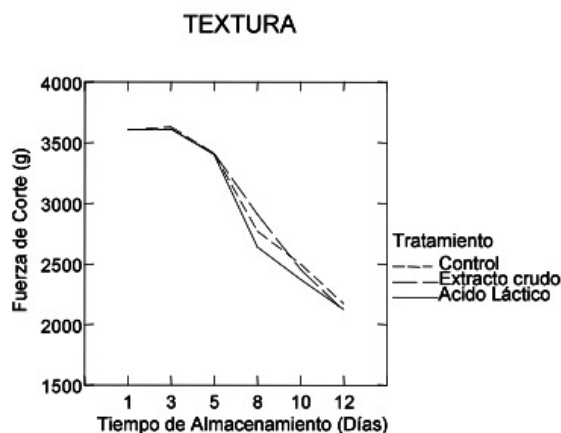


TABLA 2

Pérdida porcentual de peso en los cortes de solomo redondo (*Longissimus dorsi*), durante 12 días de almacenamiento con ácido láctico, extracto crudo de bacteriocinas y control.

Tiempo (Días)	3	5	8	10	12
Tratamiento					
Acido Láctico	4.60 ± 0.24 ^a	3.65 ± 0.08 ^a	5.24 ± 0.18 ^a	7.60 ± 0.39 ^a	4.56 ± 0.33 ^a
Extracto crudo bact	2.57 ± 0.15 ^b	2.47 ± 0.34 ^b	4.47 ± 0.12 ^a	7.02 ± 0.03 ^b	4.38 ± 0.16 ^a
Control	1.65 ± 0.34 ^c	4.97 ± 0.23 ^c	5.17 ± 0.86 ^a	6.46 ± 0.28 ^c	5.33 ± 0.30 ^b

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

croorganismos mesófilos y psicrotrófilos que presentan niveles elevados para esos días. Para el tratamiento con ácido láctico y el control, el aroma alcanzo niveles de 4 (límite de aceptación) desde el día 10 de almacenamiento, mientras que con extracto crudo de bacteriocinas estos valores solo se presentaron el día 12.

La apariencia y el color se mantuvieron sobre el límite de aceptación para las muestras de carne (valor 4), sin embargo los tratamientos con ácido láctico y extracto crudo de bacteriocinas afectaron estos atributos de calidad que fueron percibidos por el panel sensorial con mayor acentuación, obteniendo hasta el día 8 menores puntajes que el control.

DISCUSIÓN

Determinación de la actividad del extracto crudo de bacteriocinas

Resultados similares en la actividad del extracto crudo de bacteriocinas fueron reportados por Gutiérrez et al (16) cuando encontraron actividad antagonica del

extracto crudo producido por *Lb. Plantarum* sobre el crecimiento in vitro de *Salmonella*, *E. coli* y *Listeria monocytogenes*, demostrando el potencial bactericida de estos extractos sobre microorganismos de interés en alimentos.

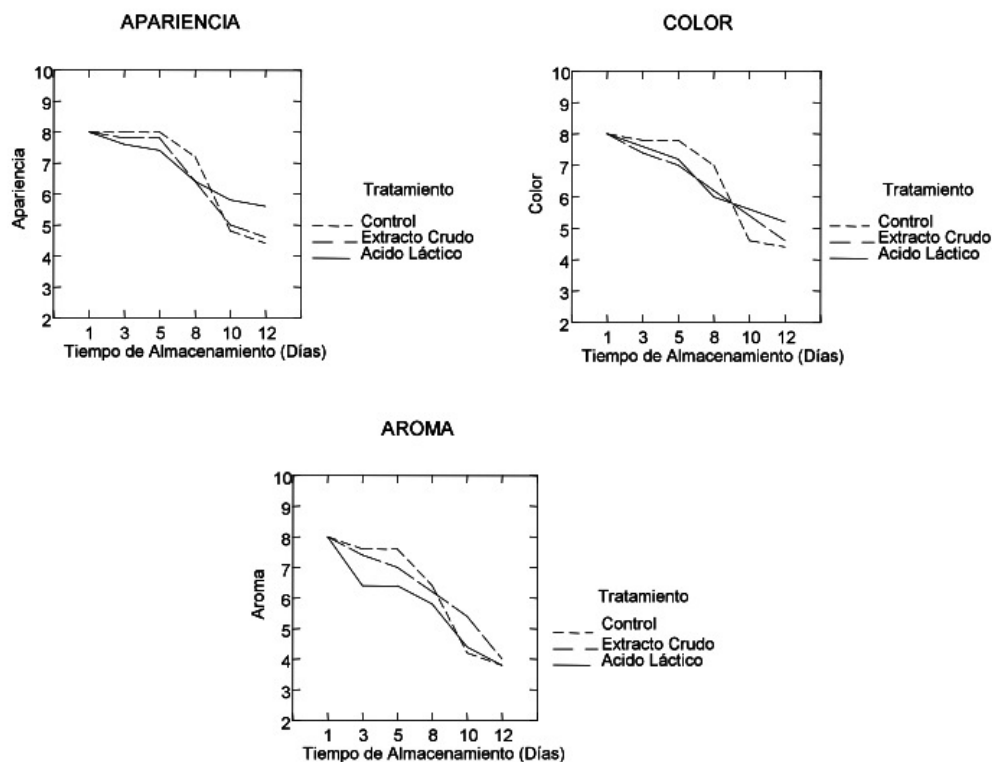
Análisis microbiológicos

Según ICMSF (17) los recuentos de mesófilos obtenidos al inicio de la investigación, indican un buen estado inicial de calidad microbiológica de la carne y los valores encontrados en el final del periodo de almacenamiento en los conteos de mesófilos, corresponden según García et al (3), al inicio del deterioro de las carnes (7 Log UFC/g), lo que permite concluir que el tiempo y las condiciones de almacenamiento influyeron en el deterioro de las carnes independiente del tratamiento aplicado.

Por otro lado, los resultados de los microorganismos psicrotrófilos, indican que las muestras de carne tratadas con ácido láctico y control llegaron a niveles deteriorantes desde el día 10, mientras que el extracto

FIGURA 3

Cambios sensoriales en los cortes de solomo Redondo (*Longissimus dorsi*), durante 12 días de almacenamiento con ácido láctico, extracto crudo de bacteriocinas y control



crudo de bacteriocinas logró incrementar la vida útil de la carne en 2 días más (hasta el día 12), concordando con lo afirmado por García et al (3), donde mencionan que niveles de 7 log UFC/g indican la presencia de malos olores y para valores de 8 ciclos log UFC/g existe desarrollo de limosidad en las carnes.

Las detecciones de esporas sulfito reductoras en el día 3 de almacenamiento, podrían indicar una mala lectura microbiológica o contaminación de la muestra de carne, teniendo en cuenta que las lecturas no se presentaron en ningún otro momento de la investigación. Según Smulders (18) estas eventualidades, pueden presentarse debido a la dificultad de controlar los niveles iniciales de contaminación en cada trozo de carne y a la capacidad de reproducción de cada especie bacteriana.

El extracto crudo de bacteriocinas mostró ser el mejor tratamiento para control de coliformes fecales, durante todo el tiempo de almacenamiento. Resultados de inhibición de *Salmonella*, *E.coli* y *Listeria* fueron reportados por Gutiérrez et al (16), utilizando extracto crudo de bacteriocinas producido por *Lactobacillus plantarum* LPBM10. De forma similar Todorov y Dicks (9), comprueban la acción antagonista de algunas bacteriocinas sobre bacterias gram negativas. En esta investigación el extracto crudo de bacteriocinas mostró tener un efecto bacteriostático sobre bacterias fecales manteniendo valores alrededor de 1.5 log NMP/g, mientras que la actividad del extracto crudo de bacteriocinas in vitro tuvo un efecto bactericida.

En el control de mesófilos, psicrotrófilos y coliformes totales, el extracto crudo de bacteriocinas tuvo un efecto bactericida más rápido y más efectivo que el ácido láctico, (disminuyó más ciclos log) efecto que se pierde después del día 3, en ningún caso se presentó inhibición total de los microorganismos evaluados, posiblemente por interacción con sustancias presentes en la matriz alimentaria como grasa y enzimas resultantes de la descomposición proteica por parte de los microorganismos o de las enzimas endógenas de la carne. Fiorentini et al (5), también reportaron que las cantidades de flora mesófila y psicrotrófila fueron inferiores en carnes tratadas con sobrenadantes obtenidos a partir de *Lactobacillus plantarum* BN durante 12 días de almacenamiento.

De otra parte la acción del ácido orgánico pudo verse afectada por la carga microbiana inicial, temperatura y concentración del ácido (1), evento que posiblemente podría explicar la baja efectividad del ácido láctico frente a los microorganismos evaluados.

Otro de los motivos por los cuales no hubo inhibición total de los microorganismos por el extracto crudo de bacteriocinas, fue posiblemente porque la cantidad de bacteriocinas producida en el extracto no fue su-

ficiente para inhibir la cantidad de microorganismos que se desarrollaron en la carne. Vignolo et al (19) evaluaron la inhibición de *Listeria monocytogenes* utilizando una cepa bacteriocinogénica de *Lb. curvatus* CRL705, y su bacteriocina lactocina AL705 en puré de carne, encontrando que la eficacia en el crecimiento de este agente patógeno, depende de las concentraciones de ambos (bacterias y bacteriocinas). La inhibición de *L. monocytogenes* en carne fue mejor cuando habían altos niveles de lactocina AL705 y baja cantidad inicial de células del agente patógeno. En este sentido es conveniente mantener altos estándares de normas de higiene durante el procesamiento de carne, junto con un estricto control de saneamiento, para asegurar que la cantidad inicial de microorganismos presentes en la carne puedan ser controlados por metodologías de biopreservación. Al respecto, Castellano et al (20) señala que las bacteriocinas no deben ser consideradas como inhibidores por sí mismas, sino que son una barrera que actúa sinérgicamente con otras técnicas de preservación, en donde los efectos combinados del pH, temperatura y disponibilidad de oxígeno deben ser tenidas en cuenta al evaluar las adiciones de BAL o sus bacteriocinas.

Por otra parte, el tipo y la cantidad de microorganismos que se desarrollan en la carne durante el almacenamiento, depende de diversos factores intrínsecos y extrínsecos que regulan el crecimiento microbiano. Los factores intrínsecos son predominantemente químicos (concentración y disponibilidad de nutrientes, pH, potencial redox, amortiguadores, actividad de agua, estructura de la carne), mientras que los extrínsecos están relacionados con el almacenamiento y las condiciones de transformación. En este estudio, dado que la carne no fue empacada al vacío, el factor que más pudo influenciar además de los tratamientos aplicados fue el almacenamiento en frío que sin duda ejerce un efecto conservante muy importante en la carne.

Los cambios de los valores de microorganismos encontrados en el presente trabajo a lo largo del periodo de almacenamiento (crecimientos y decrecimientos), también han sido reportados por otros autores, que relacionan estos cambios de la flora microbiana durante la maduración de la carne como eventos en los que influyen: el nivel inicial de microorganismos, afinidad por los sustratos, la disponibilidad de sustrato, la relativa tasa de crecimiento de las especies que compiten a diferentes temperaturas, la producción de metabolitos antimicrobianos, sucesiones en las colonias de microorganismos, competencia microbiana por un sustrato limitante como la glucosa o el oxígeno, cambios de la matriz alimentaria, efectos del empaque, interacción entre especies,

cantidad, concentración y tipo de bacteriocina, entre otros (18 – 20, 15).

Análisis de pH

El incremento en los valores de pH en los diferentes tratamientos a partir del día 10 está relacionado directamente con el aumento de flora mesófila, psicrotrófila y asociado a las reacciones autolíticas, donde se generan diversos compuestos básicos como las aminas, que incrementan el pH.

Según Oliete et al (21), los valores de pH óptimos en carne de res durante el almacenamiento normalmente oscilan entre 5.47 y 5.54. Además Urrego y Cadavid (1), afirman que el pH debe caer a niveles alrededor de 5.6, concordando con lo encontrado en esta investigación en el extracto crudo de bacteriocinas durante el periodo de almacenamiento. Así mismo, cuando el pH muestra valores próximos a la neutralidad, la carne es alterada más rápidamente coincidiendo con los resultados microbiológicos después del día 10.

Análisis textura

Los resultados hallados en esta investigación en el análisis de textura fueron similares a los reportados por Oliete et al (21), quienes encontraron disminución de la dureza de carne de res a lo largo de 21 días de almacenamiento, este efecto de ablandamiento de la carne presentado a través del tiempo de almacenamiento es debido normalmente al efecto producido por la degradación enzimática de las proteínas miofibrilares (22).

Durante el proceso de maduración de la carne normalmente es presentada la disociación de la actomiosina (presente en el tejido miofibrilar), el rompimiento del sarcómero por desintegración de la línea Z y proteólisis, factores que mejoran la ternura de la carne reflejados en la prueba instrumental de fuerza de corte de los músculos. Los valores de la fuerza al corte encontrados en esta investigación son inferiores a los reportados por Goñi et al (23) en músculo longissimus dorsi a los 14 días de almacenamiento, sin embargo Santrich (13), considera el músculo longissimus dorsi como carne tierna después de alcanzar valores de resistencia al corte inferiores a 2.27 kg.

Análisis de pérdida de peso

El tratamiento con ácido láctico obtuvo mayores pérdidas de peso en el día 10 de almacenamiento, evento que podría estar relacionado con el pH alcanzado en este tratamiento, pues cuando se presenta un pH intracelular bajo puede causar contracción miofibrilar y como consecuencia pérdida de los jugos (18).

La variación de las pérdidas de peso entre trata-

mientos durante el tiempo de almacenamiento podría asociarse a los cambios que sufre la estructura de la carne durante la maduración. Según Oliete et al (21), el principal responsable de la retención de agua en el músculo es el componente proteico, durante la maduración los cambios en la permeabilidad de las membranas con el consiguiente debilitamiento de las fuerzas que aproximan las cadenas proteicas, permite la salida y entrada de las moléculas de agua en diferentes proporciones a la red miofibrilar. De otra parte Urrego y Cadavid (1), afirman que durante la maduración se produce un aumento en la capacidad de retención de agua, asociado a la reorganización intramolecular de las proteínas determinando cambios en la carga eléctrica, y aumento de la presión osmótica en el músculo. Lo que podría explicar la capacidad de retención de agua después del día 10 de almacenamiento, traducida en caída drástica de los porcentajes de pérdidas de peso.

Análisis sensorial

Resultados similares a los encontrados en la prueba sensorial de las muestras de carne, fueron reportados por Urrego y Cadavid (1), cuando rociaron filetes de carne de res con diferentes concentraciones de ácido láctico, donde no fueron reportadas alteraciones percibidas por el panel sensorial.

Las principales causas atribuidas a la pérdida de características sensoriales en las muestras de carne, fueron aromas fétidos y desagradables relacionados principalmente con la descomposición de la carne, esta situación puede ser atribuida a la acción de las enzimas proteolíticas y al desarrollo de microorganismos dentro de los que normalmente se encuentran pseudomonas, siendo las principales alteradoras de la carne almacenada en aerobiosis, consideradas como bacterias oxidativas que pueden utilizar como fuentes de energía compuestos nitrogenados generando amoníaco, hidrógeno sulfurado, indol, escatol, aminas, y otros compuestos que dan lugar a olores y sabores repugnantes cuando son detectados a través de pruebas sensoriales (2).

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, se puede concluir que la biopreservación como método de conservación de la carne, utilizando extracto crudo de bacteriocinas reveló mayor actividad bactericida durante los primeros tres días después de su aplicación a los trozos de carne, siendo el mejor tratamiento en el control de coliformes fecales y permitió aumentar la vida útil de la carne por dos días más.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la extensión de la vida útil de carne refrigerada mediante la

aplicación de extracto crudo de bacteriocinas producido por *Lactobacillus plantarum* LPBM10. Se utilizaron filetes de solomo redondo (*longissimus dorsi*) almacenados durante 12 días a 3° C y analizados por medio de análisis microbiológicos, pH, textura, pérdidas de peso y sensoriales. Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para psicrotrófilos y coliformes totales, resultando mejor el tratamiento con extracto crudo de bacteriocinas que tuvo efecto bactericida. Los coliformes fecales también fueron inhibidos por el extracto crudo de bacteriocinas. Los cambios de pH y pérdida de peso presentan variaciones estadísticas entre tratamientos y entre días. La fuerza de corte disminuyó durante el tiempo de almacenamiento en todos los tratamientos mejorando la terneza de la carne sin presentar diferencia significativa. La apariencia, color y aroma disminuyeron el valor de aceptación a medida que avanzo el tiempo.

Palabras clave: carne; biopreservación; refrigeración; bacteriocinas; *Lactobacillus plantarum* LPBM10.

Dirigir la correspondencia a:

Profesor
Héctor Suárez Mahecha
Departamento de Ingeniería Agrícola
y de Alimentos.
Facultad de Ciencias Agropecuarias.
Universidad Nacional de Colombia,
sede Medellín, Colombia.
Fono: 57(4)4309016
Fax: 57(4)4309016
E-mail: hsuarezm@unalmed.edu.co

Agradecimientos: Los autores agradecen al grupo de investigación en Biotecnología Microbiana de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, por el aporte de la cepa de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y a la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín por permitir el desarrollo de la investigación en sus laboratorios.

BIBLIOGRAFÍA

1. Urrego Velásquez, MC, Cadavid Rojas LA. 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). Trabajo de grado Especialización en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia. Medellín – Colombia 2005.
2. Fadda S, Chambon C, Champomier-Verge`s MC, Talon R, Vignolo G. *Lactobacillus* role during conditioning of refrigerated and vacuum-packaged Argentinean meat, *Meat Sci* 2008; 79: 603–610.
3. García T, Martin R, Sanz B, Hernández PE. Extensión de la vida útil de la carne fresca. I envasado en atmósfera modificada y utilización de bacterias ácido lácticas y bacteriocinas, *Rev Española de Cienc Tecnol Al* 1995; 35 (1): 1-18.
4. Chen H. & Hower DG. Bacteriocins and their Food Applications. *Food Sci Food Saf* 2003; 2: 82-100.
5. Fiorentini Angela M, Sant'Anna Ernani S, Porto Anna CS, Mazo Jaciara Z. Franco Bernadette DGM. Influence of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* bn in the shelf-life of refrigerated bovine meat, *Brazilian J Microbiol* 2001; 32:42-46
6. Moreira Do Santos, Wagner Luiz. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producidas por *Pediococcus* sp 347 de origen cárnico. Tesis Doctorado. Departamento de Nutrición y Bromatología III. Universidad complutense de Madrid. Facultad de veterinaria. Madrid -España. 1993.
7. Gálvez A, Abriouel H, Lucas López R, Ben Omar N. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation, *Int J Food Microbiol* 2007; 120: 51-70.
8. Ogunbanwo ST, Sanni AL & Onilude AA. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1, *J Biotechnol* 2003; 2(8): 219-227.
9. Todorov SD, Dicks LMT. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram negative bacteria, *Enz Microbial Tech* 2005; 36: 318-326.
10. Ferial Caceres P. Aislamiento y caracterización Bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 en suero de leche. Tesis Maestría en Biotecnología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Medellín – Colombia 2007.
11. 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: 504–510.
12. Gyol Shin H, Min Chol Y, Kyoung Kim H, Chul Ryu Y, Hoon Lee S, Chul Kim B. Tenderization and fragmentation of myofibrillar proteins in bovine *longissimus dorsi* muscle using proteolytic extract from *Sarcodon aspratus*. *LWT* 2008; 41: 1389 -1395
13. Santroch Vacca Diana. Evaluación de la calidad y composición química de la carne de res proveniente de animales de dos grupos de edad en Puerto Rico. Tesis Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad de Puerto Rico. Recinto universitario de Mayagüez - Puerto Rico. 2006.
14. Ruiz de Huidobro E Miguel, B. Blazquez, E. Onega.

- A comparison between two methods (Warner-Bratzler and texture profile analysis) for testing either raw meat or cooked meat. *Meat Sci* 2005; 69: 527-536.
15. Suárez MH Francisco A, Beirao L. Influencia de bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 sobre la vida útil de filetes del híbrido de cachama *Piaractus brachipomus* x *Colossoma macropomum* empacado al vacío. *VITAE* 2008; 15 (1): 32-40.
 16. Gutiérrez Ramírez L, Montoya Campuzano O, Ruiz Villadiego 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*, *Rev CENIC Cien Biol.* 2005; 1 (36).
 17. ICMSF (Internacional Commission of microbiological Specifications for Foods). *Ecol Microb Product A1* 1998; 6: 30 -35.
 18. Smulders FJM. Preservation by microbial decontamination, the surface treatment of meats by organic acids. En: GOULD, G.W. New methods of food preservation. Blackie academic & professional Inglaterra. 1995; pp 253-279.
 19. Vignolo G, Fadda S, Kairuz MN, Holgado AR, Oliver G. Control of *Listeria monocytogenes* in ground beef by lactocina 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL705, *Int J Food Microbiol* 1996; 29: 397-402.
 20. 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.
 21. Oliete B, Moreno T, Carballo JA, Monserrat L, Sanchez 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.
 22. Koohmaraie M., Biochemical factors regulating the toughening and tenderisation process of meat. *Meat Sci* 1996; 43: 193 - 201.
 23. Goñi MV, Beriain MJ, Indurain G, Insausti K. Predicting longissimus dorsi texture characteristics in beef based on early post-mortem colour measurements. *Meat Sci* 2007; 76: 38-45.