



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN CIENCIAS BÁSICAS Y DE LA SALUD

EFFECTO DE LA FERMENTACIÓN
LÁCTICA SOBRE LAS PROPIEDADES
FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS
CÁRNICAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

MARCELO LISANDRO SIGNORINI PORCHIETTO

Este trabajo de investigación fue realizado con una beca otorgada por el Gobierno de México a través del Instituto Mexicano de Cooperación Internacional (IMEXCI) de la Secretaría de Relaciones Exteriores.

El Doctorado en biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Posgrados de excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del consejo, con el convenio **471-01 doctorado en Biotecnología**.

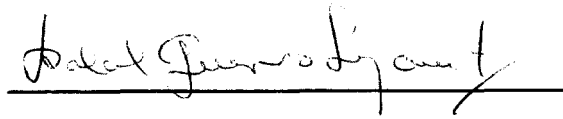
El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó
la tesis que presentó

MARCELO LISANDRO SIGNORINI PORCHIETTO

El día de octubre del año de 2002

Comite tutorial:

Directora: Dra. Isabel Guerrero Legarreta



Asesor: Dra. Edith Ponce Alquicira

Asesor: Dr. Juan Alfredo Salazar Montoya

Sinodal: Dr. Humberto Hernández

Sinodal: Dr. Francisco Fernandez Perrino

Dedicatorias

*“...el futuro se hace a mano y sin permiso
arando el porvenir con viejos bueyes...”*
Silvio Rodriguez

- A mi mamá, dio su vida cuidándonos y protegiéndonos. En el lugar del cielo en que se encuentre, espero que reciba este trabajo como una pequeña muestra de todo el amor que le tengo.
- A Mercedes, Andrea y Romina, por los días que les robé durante el desarrollo de esta tesis y por haberme seguido en este emprendimiento.
- A Mily, Daniel, Juan Manuel, Emilia, Patricia, Sole, Diego, Paula y Santiago; mi familia. Por su total apoyo en todas mis decisiones, aún en aquellas en las que no estaban de acuerdo. Su ayuda y aliento fueron fundamentales para alcanzar los objetivos que me propuse durante este período de mi vida.

Agradecimientos

- A la Secretaría de Relaciones Exteriores quienes, por medio de su apoyo, permitieron mi estancia en México.
- A la Universidad Autónoma Metropolitana por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de alcanzar esta meta.
- A Ernesto, Silvia, Alfonso, Roberto, Octavio, Basy, Raquel, Julio, Hugo, Elvia, Ruth, Conny, Sandy, Isela, Rocío y Cuahutemoc; mis compañeros en el Laboratorio del Área de Macromoléculas durante estos tres años. Me hicieron sentir parte de un grupo entrañable, como en mi propia casa.
- A mis compañeros del Departamento de Salud Pública Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias de Esperanza (Argentina), por haberme dado la oportunidad y las facilidades para estudiar en México.
- A Laureano, Chiquito, Diego y Raquel; nunca me dejaron solo, estaban conmigo en todos sus mensajes, me hicieron sentir que aún estaban cerca mio burlando las distancias geográficas.
- A mis tíos y primos que durante estos años se mantuvieron en permanente contacto, siempre me dieron su aliento en cada mensaje y carta que recibía con ansiedad.
- A la Dra. Lourdes Pérez Chabela, con quien me he divertido muchísimo y he pasado gratos momentos en el Laboratorio.
- Al Dr. Francisco Fernández, una persona increíble a quien respeto como profesional intachable y como amigo. Aprecio sus correcciones y le debo una pluma roja.
- Al Dr. Juan Alfredo Salazar, por la predisposición mostrada para colaborar en este trabajo y su amabilidad al recibirme cada vez que lo solicité.
- A la Dra. Edith Ponce, quien no solamente me rescató de mis numerosos naufragios científicos, sino además me brindó su amistad en todo momento.
- A la Dra. Isabel Guerrero. Sin ella yo no estaría escribiendo mi tesis doctoral. Gracias por confiar en mí aún cuando no me conocía, por haberme dado la oportunidad y su tiempo para venir a México, por toda su ayuda en estos tres años. Por hacerme sentir que tomé la mejor decisión de mi vida profesional al aceptar su propuesta de estudiar en México.
- A México y su gente, por ser el país que ha abierto las puertas a miles de argentinos que como yo, encontramos en esta tierra un lugar para creer, crecer y amar.

RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue estudiar las modificaciones en la carne bovina sujeta a tratamientos ácidos para extender la vida útil y la funcionalidad de las proteínas miofibrilares de carne roja sujeta a estos tratamientos y su posible cambio estructural.

Porciones de músculo *Psoas major* de bovino fueron inoculados con tres bacterias alterantes separadamente, obteniéndose una concentración final de 10^3 UFC/g de carne. *Pseudomona fluorescens* B52, *Brochothrix thermosphacta* (NCIB-10018) y *Lactobacillus minor* 119B fueron las cepas utilizadas. Posteriormente la carne fue sometida a cuatro tratamientos ácidos. Se inoculó la carne con suspensiones de tres bacterias ácido lácticas empleadas como cultivos bioprotectores (*Lactobacillus carnis* MXVK76, *Lactobacillus pentosus* LP1-31035 y *Staphylococcus carnosus* MC1-02055), alcanzando una concentración aproximada de 10^5 UFC/g de carne. Finalmente se empleó una solución acuosa de ácido láctico al 2%, obteniéndose una concentración de 200 mg/100g de carne. Los controles se prepararon sin la adición de ningún tratamiento ácido. La carne fue envasada al vacío y se incubaron a 4 y 20 °C durante 12 y 6 días respectivamente. En la carne almacenada a 4 °C se realizaron muestreos a los días 0, 4, 8 y 12; mientras que para la carne almacenada a 20 °C, 0, 2, 4 y 6 fueron los días escogidos.

En cada muestreo se evaluó la concentración de bacterias mesófilas totales, bacterias lácticas totales, enterobacterias totales, *Pseudomonas* spp., *B. thermosphacta* y bacterias lácticas heterofermentativas. Adicionalmente se estudiaron los cambios sufridos en el pH cárnico, concentración de ácidos grasos libres de cadena larga, producción de aminos biogénicos, así como la hidrólisis sufrida por las proteínas miofibrilares. Asimismo se obtuvieron una serie de parámetros que permitieron evaluar el efecto de los tratamientos ácidos sobre las proteínas miofibrilares y su funcionalidad; siendo éstos la solubilidad, color, concentración de grupos sulfhidrilos, propiedades de gelificación y emulsificación. Para determinar las propiedades de gelificación se realizaron pruebas de penetración de geles,

estudios reológicos dinámicos y microscopía electrónica de barrido. Los índices de actividad de emulsión, estabilidad de emulsión y capacidad de emulsión fueron estudiados para caracterizar las propiedades de emulsión de las proteínas miofibrilares.

Los tratamientos ácido lácticos lograron reducir la población de microorganismos alterantes en la carne almacenada en refrigeración y en abuso térmico. El ácido láctico evidenció las mayores reducciones en la cuenta de los diferentes microorganismos alterantes, siendo más notorio en la carne almacenada en refrigeración. Reflejo de estos resultados fueron los menores valores de pH obtenidos en la carne tratada con ácido láctico. Las bacterias bioprotectoras lograron reducir el pH cárnico solo cuando la carne fue almacenada en refrigeración.

Ácido láctico redujo la producción de histamina, putrescina y cadaverina, no observándose dicho efecto en los tratamientos con cultivos bioprotectores. Adicionalmente los tratamientos ácido lácticos redujeron la concentración de ácidos grasos libres cuando la carne se almacenó en refrigeración.

Las principales proteínas miofibrilares (miosina y actina) sufrieron proteólisis en la carne almacenada a 20 °C independientemente del tratamiento empleado, sugiriéndose un origen endógeno debido a que la carne presentó pH óptimos para la actividad de las enzimas lisosomales del músculo.

El ácido láctico generó cambios indeseables en el color de la carne, presentándose una mayor luminosidad y tonalidad e inferior índice de decoloración a ambas temperaturas de almacenamiento, mientras que los cultivos bioprotectores no produjeron dichas alteraciones en el color de la carne.

Las propiedades de gelificación sufrieron deterioro en la carne tratada con ácido láctico independientemente de la temperatura de almacenamiento al considerar la menor rigidez y módulo de almacenamiento obtenidos en las pruebas de penetración de geles y estudios El

objetivo de esta tesis fue estudiar las modificaciones en la carne bovina sujeta a tratamientos ácidos para extender la vida útil y la funcionalidad de las proteínas miofibrilares de carne roja sujeta a estos tratamientos y su posible cambio estructural.

Porciones de músculo *Psoas major* de bovino fueron inoculados con tres bacterias alterantes separadamente, obteniéndose una concentración final de 10^3 UFC/g de carne. *Pseudomona fluorescens* B52, *Brochothrix thermosphacta* (NCIB-10018) y *Lactobacillus minor* 119B fueron las cepas utilizadas. Posteriormente la carne fue sometida a cuatro tratamientos ácidos. Se inoculó la carne con suspensiones de tres bacterias ácido lácticas empleadas como cultivos bioprotectores (*Lactobacillus carnis* MXVK76, *Lactobacillus pentosus* LP1-31035 y *Staphylococcus carnosus* MC1-02055), alcanzando una concentración aproximada de 10^5 UFC/g de carne. Finalmente se empleó una solución acuosa de ácido láctico al 2%, obteniéndose una concentración de 200 mg/100g de carne. Los controles se prepararon sin la adición de ningún tratamiento ácido. La carne fue envasada al vacío y se incubaron a 4 y 20 °C durante 12 y 6 días respectivamente. En la carne almacenada a 4 °C se realizaron muestreos a los días 0, 4, 8 y 12; mientras que para la carne almacenada a 20 °C, 0, 2, 4 y 6 fueron los días escogidos.

En cada muestreo se evaluó la concentración de bacterias mesófilas totales, bacterias lácticas totales, enterobacterias totales, *Pseudomonas* spp., *B. thermosphacta* y bacterias lácticas heterofermentativas. Adicionalmente se estudiaron los cambios sufridos en el pH cárnico, concentración de ácidos grasos libres de cadena larga, producción de aminas biogénicas, así como la hidrólisis sufrida por las proteínas miofibrilares. Asimismo se obtuvieron una serie de parámetros que permitieron evaluar el efecto de los tratamientos ácidos sobre las proteínas miofibrilares y su funcionalidad; siendo éstos la solubilidad, color, concentración de grupos sulfhidrilos, propiedades de gelificación y emulsificación. Para determinar las propiedades de gelificación se realizaron pruebas de penetración de geles, estudios reológicos dinámicos y microscopía electrónica de barrido. Los índices de actividad de emulsión, estabilidad de emulsión y capacidad de emulsión fueron estudiados para caracterizar las propiedades de emulsión de las proteínas miofibrilares.

Los tratamientos ácido lácticos lograron reducir la población de microorganismos alterantes en la carne almacenada en refrigeración y en abuso térmico. El ácido láctico evidenció las mayores reducciones en la cuenta de los diferentes microorganismos alterantes, siendo más notorio en la carne almacenada en refrigeración. Reflejo de estos resultados fueron los menores valores de pH obtenidos en la carne tratada con ácido láctico. Las bacterias bioprotectoras lograron reducir el pH carnico solo cuando la carne fue almacenada en refrigeración.

Ácido láctico redujo la producción de histamina, putrescina y cadaverina, no observándose dicho efecto en los tratamientos con cultivos bioprotectores. Adicionalmente los tratamientos ácido lácticos redujeron la concentración de ácidos grasos libres cuando la carne se almacenó en refrigeración.

Las principales proteínas miofibrilares (miosina y actina) sufrieron proteólisis en la carne almacenada a 20 °C independientemente del tratamiento empleado, sugiriéndose un origen endógeno debido a que la carne presentó pH óptimos para la actividad de las enzimas lisosomales del músculo.

El ácido láctico generó cambios indeseables en el color de la carne, presentándose una mayor luminosidad y tonalidad e inferior índice de decoloración a ambas temperaturas de almacenamiento, mientras que los cultivos bioprotectores no produjeron dichas alteraciones en el color de la carne.

Las propiedades de gelificación sufrieron deterioro en la carne tratada con ácido láctico independientemente de la temperatura de almacenamiento al considerar la menor rigidez y módulo de almacenamiento obtenidos en las pruebas de penetración de geles y estudios reológicos dinámicos, respectivamente; así como la pérdida de estructura de los geles observados mediante microscopía electrónica de barrido.

La concentración de grupos sulfhidrilos y las propiedades de emulsificación de las proteínas miofibrilares, no sufrieron cambios significativos al someter a la carne a los diferentes tratamientos ácido lácticos.

El tratamiento de la carne con ácido láctico puede emplearse eficazmente para controlar la flora microbiana alterante y los metabolitos generados por su actividad sobre el sustrato cárnico, pero genera cambios significativos en las propiedades funcionales de las proteínas cárnicas. Las bacterias bioprotectoras pueden emplearse para controlar la microflora alterante sin modificar las propiedades funcionales de las proteínas miofibrilares de la carne.

ABSTRACT

The objective of this thesis was to study the effect of lactic acid treatments as a method to increase beef shelf-life, as well as the functional properties of myofibril proteins as they relate to their structural changes.

Portions of bovine *Psoas major* muscle were inoculated with three spoilage bacteria (10^3 CFU/g): *Pseudomona fluorescens* B52, *Brochothrix thermosphacta* (NCIB-10018) and *Lactobacillus minor* 119B. Samples were then separately inoculated with three lactic acid strains (*Lactobacillus carnis* MXVK76, *Lactobacillus pentosus* LP1-31035 and *Staphylococcus carnosus* MC1-02055) at 10^5 CFU/g. As a mean of comparison, beef was also treated with 2% lactic acid (200 mg/100g). After inoculation or acid treatment, samples were vacuum packaged and stored at 4 and 20 °C during 12 and 6 days, respectively.

Total mesophiles, total lactic acid bacteria, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp., *B. thermosphacta* and heterofermentative lactic acid bacteria were enumerated. Physicochemical characteristics were also analyzed: pH, free fatty acid and biogenic amine concentration, and myofibrils protein degradation. The studied parameters related to physical properties were: solubility, sulfhydryl group concentration, gelation and emulsification properties of myofibrils proteins, and color.

Lactic acid from chemical or microbial origin reduced spoilage bacteria counts at both storage temperatures, although lactic acid in its chemical form was more efficient in controlling proliferation of spoilage microflora. Meat treated with lactic acid had the lowest pH at both temperatures, whereas bioprotective cultures required storage at refrigeration conditions to promote pH reduction. Lactic acid also reduced histamine, putrescine and tyramine production, as well as free fatty acid concentration when samples were stored at 4 °C.

Myosin and actin were considerably hydrolyzed in samples at 20°C in all treatments. This fact could be explain as a consequence of endogen enzyme activities. Beef color was altered by lactic acid treatments but not by bioprotective strains; inoculated samples showed

higher lightness and hue values, and lower decoloration index at both storage temperatures. Lactic acid also affected gelation of myofibrils proteins at both storage temperatures, resulting in low rigidity and storage moduli when analyzed by a gel penetration test and dynamic rheology. Lactic acid, either of chemical or microbial source, had no effect on sulfhydryl group concentration or emulsification properties.

Lactic acid, in its chemical form, can efficiently control proliferation of meat spoilage microflora and their metabolites, extending the shelf life although reduction in meat protein functional properties was observed. On the other hand, lactic acid strains are able to control spoilage bacteria without considerably modifying beef protein functional properties.

Índice General

	Página
RESUMEN	I
ABSTRACT	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
ÍNDICE DE TABLAS	XIV
ÍNDICE DE ECUACIONES	XVI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	4
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Importancia de la carne en el consumo humano	5
3.2 Química de la carne	6
3.2.1 Proteínas de la célula muscular	8
3.2.1.1 Proteínas miofibrilares	8
3.2.1.1.1 Miosina	8
3.2.1.1.2 Actina	10
3.2.1.1.3 Otras proteínas miofibrilares	10
3.2.1.2 Proteínas solubles	12
3.2.1.3 Proteínas del estroma	13
3.2.2 Composición lipídica de la carne	13
3.2.3 Composición de carbohidratos en la carne	14
3.3 Microbiología de la carne	15
3.4 Seguridad de la carne	21
3.4.1 Fermentación Láctica como medio de conservación	22
3.4.2 Preservación mediante ácidos orgánicos	26
3.5 Propiedades funcionales	30
3.5.1 Color	32
3.5.2 Solubilidad	38
3.5.3 Propiedades de emulsificación	40

	página
3.5.4 Propiedades de gelificación	46
4. OBJETIVOS	51
5. MATERIALES Y MÉTODOS	52
5.1 Obtención de las muestras	52
5.2 Preparación de los inóculos	52
5.2.1 Bacterias alterantes	52
5.2.2 Bacterias ácido lácticas	53
5.2.3 Ácido láctico	54
5.3 Almacenamiento de las muestras	54
5.4 Análisis microbiológicos	55
5.5 Determinación de pH	55
5.6 Actividad lipolítica	56
5.7 Actividad aminodescarboxilasa	57
5.8 Extracción de proteínas miofibrilares	58
5.9 Actividad proteolítica	59
5.10 Solubilidad	60
5.11 Determinación de grupos sulfhidrilo	60
5.12 Propiedades de gelificación	61
5.12.1 Pruebas de penetración de geles	61
5.12.2 Estudios reológicos dinámicos (G' , G'' , $\text{Tan } \delta$)	62
5.12.3 Microscopía Electrónica de Barrido	62
5.13 Propiedades de emulsificación	63
5.13.1 Índice de Actividad de Emulsión	63
5.13.2 Índice de Estabilidad de Emulsión	65
5.13.3 Capacidad de Emulsión	65
5.14 Determinación de color	65
5.15 Análisis estadísticos	66
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	68

	página
6.1	Análisis microbiológicos 68
6.1.1	Carne almacenada a 4 °C 68
6.1.2	Carne almacenada a 20 °C 72
6.2	Determinación de pH 75
6.2.1	Carne almacenada a 4 °C 75
6.2.2	Carne almacenada a 20 °C 78
6.3	Actividad lipolítica 79
6.3.1	Carne almacenada a 4 °C 80
6.3.2	Carne almacenada a 20 °C 82
6.4	Actividad aminodescarboxilasa 83
6.4.1	Carne almacenada a 4 °C 84
6.4.2	Carne almacenada a 20 °C 87
6.5	Actividad proteolítica 90
6.5.1	Carne envasada a 4 °C 90
6.5.2	Carne envasada a 20 °C 93
6.6	Solubilidad proteica 98
6.6.1	Carne almacenada a 4 °C 98
6.6.2	Carne almacenada a 20 °C 99
6.7	Determinación de grupos sulfhidrilos 101
6.7.1	Carne almacenada a 4 °C 101
6.7.2	Carne almacenada a 20 °C 102
6.8	Propiedades de gelificación 103
6.8.1	Carne almacenada a 4 °C 103
6.8.2	Carne almacenada a 20 °C 110
6.9	Propiedades de emulsificación 114
6.9.1	Carne almacenada a 4 °C 115
6.9.2	Carne almacenada a 20 °C 118
6.10	Determinación de color 121
6.10.1	Carne almacenada a 4 °C 121

	página
6.10.2 Carne almacenada a 20 °C	126
7. CONCLUSIONES	131
8. BIBLIOGRAFÍA	135
9. ANEXO 1: ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	169

Índice de Figuras

	página
Figura 1: Niveles de organización del músculo	7
Figura 2: Diagrama de la miosina y sus subfragmentos	9
Figura 3: Rutas metabólicas para la formación de aminas biogénicas	17
Figura 4: Estructura de la mioglobina	33
Figura 5: Sólido de color L* a* b*	36
Figura 6: Comparación de los espectros de reflectancia para soluciones de mioglobina, oximioglobina y metamioglobina	38
Figura 7: Calorimetría diferencial de barrido para miosina	47
Figura 8: Diagrama general del protocolo experimental	67
Figura 9: Análisis microbiológicos en carne almacenada a 4 °C	70
Figura 10: Análisis microbiológicos en carne almacenada a 20 °C	74
Figura 11: Evolución del pH en carne almacenada a 4 °C	76
Figura 12: Evolución del pH en carne almacenada a 20 °C	79
Figura 13: Concentración de ácidos grasos libres (mg/g) en carne inoculada con <i>B. thermosphacta</i> y almacenada a 4 °C	81
Figura 14: Concentración de ácidos grasos libres (mg/g) en carne inoculada con <i>B. thermosphacta</i> y almacenada a 20 °C	83
Figura 15: Concentración de aminas biogénicas en carne almacenada a 4 °C	85
Figura 16: Concentración de aminas biogénicas en carne almacenada a 20 °C	89
Figura 17: Geles de electroforesis y densitogramas en carne almacenada a 4 °C	91
Figura 18: Geles de electroforesis y densitogramas en carne almacenada a 20 °C	95
Figura 19: Solubilidad de las proteínas miofibrilares en carne almacenada a 4 °C	98
Figura 20: Solubilidad de las proteínas miofibrilares en carne almacenada a 20 °C	100
Figura 21: Concentración de grupos SH en proteínas miofibrilares de carne almacenada a 4 °C	102
Figura 22: Concentración de grupos SH en proteínas miofibrilares de carne almacenada a 20	103

	página
Figura 23: Penetración de geles de proteínas miofibrilares (4 °C)	104
Figura 24: Módulo de almacenamiento (G') de carne almacenada a 4 °C	106
Figura 25: Microscopía electrónica de barrido de geles de proteínas miofibrilares	109
Figura 26: Penetración de geles de proteínas miofibrilares (20 °C)	111
Figura 27: Módulo de almacenamiento (G') de carne almacenada a 20 °C	113
Figura 28: Parámetros de emulsión (IAE, IEE y CE) de carne almacenada a 4°C	116
Figura 29: Parámetros de emulsión (IAE, IEE, CE) de carne almacenada a 20 °C	119
Figura 30: Parámetros de color de la carne almacenada a 4 °C	122
Figura 31: Parámetros de color de lacarne almacenada a 20 °C	127

Índice de Tablas

	página
Tabla 1: Consumo Nacional Aparente.....	5
Tabla 2: Proteínas miofibrilares del músculo esquelético.....	11
Tabla 3: Composición de ácidos grasos de la grasa bovina.....	13
Tabla 4: Funcionalidad de las proteínas en sistemas alimenticios.....	31
Tabla 5: Programa de elución para el análisis de aminas biogénicas.....	58
Tabla 6: Crecimiento de bacterias mesófilas totales.....	169
Tabla 7: Crecimiento de bacterias lácticas.....	170
Tabla 8: Crecimiento de enterobacterias.....	171
Tabla 9: Crecimiento de <i>Pseudomonas spp</i>	172
Tabla 10: Crecimiento de <i>Brochothrix thermosphacta</i>	173
Tabla 11: Crecimiento de bacterias lácticas heterofermentativas.....	174
Tabla 12: pH cárnico.....	175
Tabla 13: Concentración de ácido palmítico.....	176
Tabla 14: Concentración de ácido oléico.....	177
Tabla 15: Concentración de ácido esteárico.....	178
Tabla 16: Concentración de histamina.....	179
Tabla 17: Concentración de tiramina.....	180
Tabla 18: Concentración de putrescina.....	181
Tabla 19: Concentración de cadaverina.....	182
Tabla 20: Concentración de la cadena pesada de miosina.....	183
Tabla 21: Concentración de actina.....	184
Tabla 22: Porcentaje de solubilidad.....	185
Tabla 23: Concentración de grupos SH libres.....	186
Tabla 24: Fuerza de penetración de geles.....	187
Tabla 25: Módulo de almacenamiento (G').....	188
Tabla 26: $\tan \delta$	189
Tabla 27: Índice de Actividad de Emulsión.....	190

	página
Tabla 28: Índice de Estabilidad de Emulsión.....	191
Tabla 29: Capacidad de Emulsión.....	192
Tabla 30: Luminosidad.....	193
Tabla 31: Cromaticidad.....	194
Tabla 32: Tonalidad.....	195
Tabla 33: Índice de Decoloración.....	196
Tabla 34: Análisis de correlación entre parámetros relacionados con la gelificación.....	197
Tabla 35: Análisis de correlación entre parámetros relacionados con la emulsificación...	198
Tabla 36: Análisis de correlación entre parámetros relacionados con el color.....	199

Índice de Ecuaciones

	página
Ecuación 1: Reacción simplificada de autooxidación de la mioglobina.....	35
Ecuación 2: Ecuación de Stokes.....	42
Ecuación 3: Índice de actividad proteolítica.....	59
Ecuación 4: Concentración de grupos SH en proteínas.....	60
Ecuación 5: Índice de actividad de emulsión.....	64
Ecuación 6: Fracción de aceite en el sistema.....	64
Ecuación 7: Tonalidad.....	66
Ecuación 8: Cromaticidad.....	66
Ecuación 9: Índice de decoloración.....	66

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

Luego de la matanza y evisceración de los bovinos, la mayoría de las características microbiológicas de las canales permanecen sin cambios. En un animal faenado en condiciones de buena salud es de esperar que las capas profundas de la carne estén libres de contaminación. No obstante un gran número de microorganismos encuentran alguna vía para llegar a la superficie durante las operaciones de limpieza o desde el contenido gastrointestinal, por contacto con operarios, pisos, paredes, agua, etc. (Guerrero y Taylor, 1994). El músculo postmortem ofrece un ambiente altamente nutritivo a la microflora contaminante, pudiendo encontrar condiciones para su crecimiento. Este proceso se acelera como resultado de abusos térmicos que acontecen a lo largo de la cadena de comercialización del producto (Nychas y col., 1988).

La proliferación microbiana en la carne depende de numerosos factores, entre los que se incluyen el tipo de microorganismos, temperatura de almacenamiento, pH, nutrimentos disponibles, potencial de óxido-reducción y la atmósfera que rodea la carne (Marshall y Bal'a, 2001).

Desde que la carne es procesada, distribuida y vendida a los consumidores a menudo lejos del procesador primario, éste debe emplear métodos para asegurar la calidad de la carne. Estos métodos deben ser capaces de inhibir o atenuar el crecimiento tanto de los organismos patógenos como de los alterantes. Además de prolongar la vida útil y mantener la calidad, las técnicas de preservación empleadas deben conservar las características fisicoquímicas de los productos crudos tanto como sea posible.

En los últimos años, la incorporación de conservadores químicos a los alimentos con el objetivo de prolongar su vida útil ha sido rechazada por los consumidores. La tendencia actual es consumir productos con bajo nivel de procesamiento (por ejemplo, tratamientos térmicos menos intensos), más naturales y con menor nivel de aditivos artificiales (colorantes, edulcorantes, estabilizantes, etc.). Estamos ante una nueva

generación de productos alimenticios con “mínimo procesamiento” (Cudjoe y Kapperud, 1991; Stiles, 1996; Hugas, 1998).

El uso de bacterias lácticas como bioconservadores en carnes ha sido considerado como una alternativa a los preservantes químicos, ya que pueden crecer en el sustrato cárnico e inhibir el desarrollo de microorganismos alterantes y patógenos. El modo de acción de estas bacterias incluye la competencia por los nutrientes, la adhesión al sustrato y la producción de ácidos orgánicos (especialmente ácido láctico), diacetilo, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Selgas y col., 1993; Aymerich y Hugas, 1998; Hugas, 1998). Algunos trabajos reportan la eficiencia de estos tratamientos como agentes bioprotectores en carnes y productos cárnicos; así como su efecto potencial en el control de las poblaciones de microorganismos alterantes (Guerrero-Legarreta y col., 1995; Nattress y col., 1998; Hugas, 1998), microorganismos patógenos (Andersen, 1995; Hugas, 1998) y sobre la concentración de aminas biogénicas (Maijala y col., 1995). La utilización de bacterias lácticas para controlar la proliferación microbiana no generó, además, cambios importantes en la calidad sensorial de la carne (Andersen, 1995).

El ácido láctico es el principal metabolito producido por las bacterias lácticas homofermentativas y ha sido utilizado como agente sanitizante en carnes, con el objetivo de incrementar la seguridad de estos alimentos. El empleo de este ácido orgánico en concentraciones inferiores a 3% puede reducir la población de microorganismos alterantes (Lamkey y col., 1991; Maca y col., 1997b; Vega y col., 1998) y generar menores tasas de crecimiento de microorganismos patógenos como *Escherichia coli* (Dixon y col., 1991), *Campylobacter jejuni* (Cudjoe y Kapperud, 1991), *Clostridium botulinum* (Mass y col., 1989), *Listeria monocytogenes* (Young y Føegeding, 1993) y *Salmonella* spp. (Dixon y col., 1991). El ácido láctico ha sido requerido para estos fines debido a que es un constituyente natural de la carne postrigor y es una sustancia aceptada como segura (GRAS) (Van Netten y col., 1994; Borpuzari y Borpuzari, 1995).

No solo es importante conocer la eficacia antimicrobiana de los tratamientos ácido lácticos con el objetivo de prolongar la vida de anaquel de la carne cruda, el efecto sobre las

propiedades funcionales de la carne es de relevancia para su procesamiento posterior y para la aceptación del producto por parte de los consumidores.

La “funcionalidad” se refiere a todas las propiedades no nutricionales de la carne que condicionan su utilidad, ya sea como ayuda en el proceso o como contribuyente directo en los atributos del alimento. Estas propiedades derivan de características fisicoquímicas que se ven afectadas durante el procesamiento, almacenamiento, preparación y consumo (Hall, 1996).

Las preferencias alimenticias de los seres humanos están normalmente basadas en atributos sensoriales como la apariencia, color, sabor y textura y las proteínas tienen un papel importante en la expresión de tales atributos (Damodaran, 1994).

JUSTIFICACIÓN

2. Justificación

El músculo postmortem ofrece un ambiente altamente nutritivo a la microflora contaminante, pudiendo satisfacer sus necesidades básicas para el crecimiento. Este proceso se acelera como resultado de abusos térmicos que acontecen a lo largo de la cadena de comercialización del producto.

El desarrollo tecnológico en el procesamiento y preservación de los alimentos ha proporcionado a los consumidores una gran selección de alimentos con una elevada vida útil. Consecuentemente, los compradores de carne han sido más conscientes de la calidad y más selectivos.

Según los resultados expuestos en la bibliografía consultada, el empleo de ácido láctico (ya sea de origen químico o microbiológico) como método de conservación satisface las exigencias actuales del consumidor y reduce la flora patógena y deteriorante, además de no producir compuestos tóxicos y no presentar efectos indeseables sobre las características sensoriales de los productos cárnicos.

Aunque se han demostrado las ventajas de utilizar ácidos orgánicos o cultivos de bacterias ácido lácticas como forma de aumentar la vida de anaquel de la carne, existen pocos informes sobre la posible alteración de las propiedades funcionales de la carne sujeta a la conservación por tratamiento ácido en la superficie.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3 Revisión Bibliográfica

3.1 Importancia de la carne en el consumo humano

Desde los tiempos más remotos, los seres humanos han deseado satisfacer el hambre con alimentos de origen animal. La importancia de la carne deriva no sólo de las características sensoriales sino también de su elevado valor nutritivo (Hultin, 1993). La calidad nutritiva del músculo no deriva solo de un contenido proteico elevado, sino también de la calidad de dicha proteína, ya que contiene todos los aminoácidos en proporciones muy similares a las requeridas para el mantenimiento y desarrollo de los tejidos humanos (Hultin, 1993).

Paralelamente, el tejido muscular es una fuente excelente de algunas vitaminas del complejo B, especialmente tiamina, riboflavina, niacina y vitaminas B6 y B12. Adicionalmente, la carne se constituye en una buena fuente de hierro y fósforo (Hultin, 1993).

La mayor parte de la carne consumida en México se deriva de las aves, bovinos y porcinos, tal como se reporta en la tabla 1.

Tabla 1: Consumo Nacional Aparente (Toneladas)

Año	Bovinos	Aves	Porcinos	Caprinos	Ovinos	Pavo
1995	1'287,132.0	1'396,599.0	1'081,819.0	37,923.8	50,849.4	90,215.2
1996	1'392,982.6	1'394,164.7	1'075,828.5	37,964.7	49,800.0	106,849.4
1997	1'470,793.3	1'609,482.4	1'112,418.0	36,819.4	58,727.2	119,837.6
1998	1'570,675.7	1'799,864.0	1'218,151.8	40,186.5	64,795.6	136,878.0
1999	1'582,893.2	1'931,332.4	1'207,486.6	38,952.2	72,527.2	142,168.7
2000	1'622,992.8	2'054,533.4	1'361,655.7	40,007.0	86,901.7	148,415.7
2001	1'642,995.2	2'170,989.0	1'503,384.7	39,830.6	94,776.6	160,948.8

(SAGARPA, 2002)

3.2 Química de la carne

Los músculos animales pueden dividirse en dos categorías principales: lisos y estriados. Los músculos lisos, menos voluminosos, poseen funciones similares a las de los músculos estriados, aún cuando su estructura histológica es diferente. Se encuentran localizados principalmente en el sistema gastrointestinal, respiratorio y cardiovascular (Kauffman, 2001).

El músculo estriado se divide en cardíaco y esquelético. El músculo cardíaco se encuentra confinado al corazón, siendo estructuralmente similar al esquelético excepto por su metabolismo altamente aeróbico, requiriendo altas concentraciones de oxígeno para llevar a cabo sus contracciones rítmicas. Presenta adicionalmente discos transversales a la fibra y su núcleo se encuentra en el centro de la célula.

El músculo esquelético, como su nombre indica, está asociado al esqueleto animal (Kauffman, 2001). Posee un papel importante en el control de la locomoción y postura, así como en la protección de los órganos vitales internos. Está constituido por células largas, estrechas y multinucleadas (Kauffman, 2001). En la figura 1 se muestra un diagrama de los niveles estructurales del músculo esquelético. Envuelto el paquete muscular existe una vaina gruesa de tejido conectivo denominada epimisio. Desde la superficie interna de éste parten otras láminas (perimisio) de tejido conectivo que penetran en el interior del músculo, separándolo en grupos de fibras. Partiendo del perimisio se forman vainas de tejido conectivo que rodean cada fibra muscular, denominándose a dichas vainas endomisio (Hultin, 1993; Kauffman, 2001).

El aspecto estriado característico del músculo esquelético se debe a la ordenación repetitiva específica de las proteínas que constituyen las miofibrillas. Las bandas oscuras (bandas A) de las miofibrillas son anisotrópicas o birrefringentes cuando se observan con luz polarizada. Las bandas más claras son isotrópicas y se las denomina "bandas I". En el centro de cada una de las bandas I existe una línea oscura, llamada línea Z. En el centro de cada banda A existe una zona clara que se denomina zona H. La unidad contráctil de la

miofibrilla se denomina sarcómero, definido como la parte de la miofibrilla localizada entre dos líneas Z adyacentes (Hultin, 1993; Kauffman, 2001).

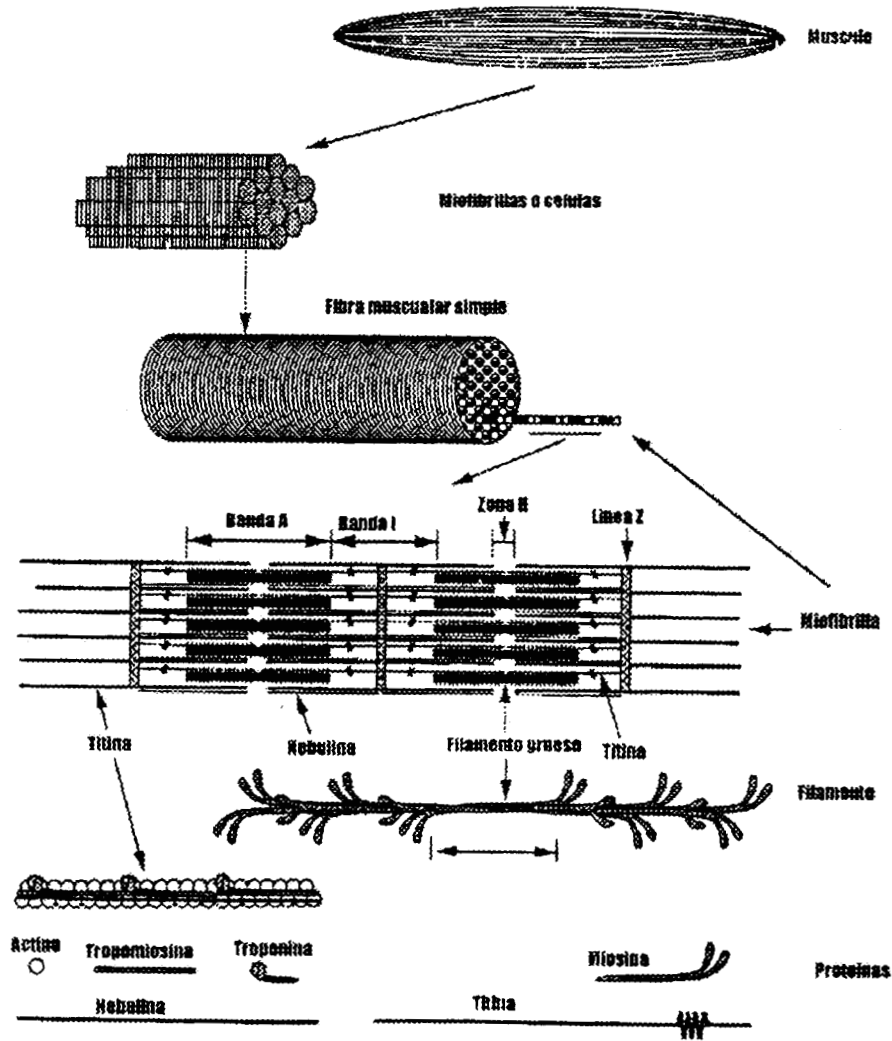


Figura 1: Niveles de organización del músculo (Kauffman, 2001)

La estructura básica de las miofibrillas, responsables de la apariencia estriada del músculo, se debe a su composición de 2 tipos de filamentos. El arreglo de filamentos gruesos, denso y anisotrópico (11 nm de diámetro) aparecen en la banda A, mientras que los filamentos delgados (5 nm) están presentes en la menos densa banda I (Hultin, 1993).

Los filamentos gruesos de la banda A están formados por un cuerpo central de colas de moléculas de la proteína miosina y sobresaliendo del filamento unos puentes transversales correspondientes a las cabezas de la miosina. Estas moléculas se unen punta con punta formando un polímero con cabezas en los extremos y un cuerpo central liso que se superpone con otros de manera intrincada. Cada filamento grueso contiene de 200 a 400 moléculas de miosina (Hultin, 1993; Kauffman, 2001).

Los filamentos delgados están constituidos básicamente por actina F (actina fibrosa), polipéptido formado por la polimerización de monómeros globulares de actina G. Dos cadenas helicoidales de actina F se unen entre sí, dando lugar a un filamento delgado que contiene de 500 a 600 monómeros globulares (Hultin, 1993; Kauffman, 2001).

El músculo esquelético posee una composición química compleja ya que contiene, además de las fibras musculares, grandes cantidades de tejido conectivo de soporte, un completo sistema vascular y nervios que controlan la función de las fibras musculares. Adicionalmente, sirve como depósito de reserva para lípidos y contiene una considerable cantidad de fluido extracelular, principalmente agua (Hultin, 1993).

3.2.1 Proteínas de la célula muscular

Las proteínas del músculo pueden dividirse en una fracción miofibrilar, una fracción sarcoplásmica y una fracción insoluble o del estroma. La fracción sarcoplásmica puede ser extraída del músculo con agua o soluciones salinas diluidas y está constituida por enzimas (como las que participan en procesos metabólicos) y el pigmento muscular mioglobina. Las proteínas miofibrilares o contráctiles son solubles en soluciones salinas de elevada fuerza iónica; mientras que la fracción insoluble permanece inalterada después del tratamiento con dichas soluciones (Hultin, 1993).

3.2.1.1 Proteínas miofibrilares

3.2.1.1.1 Miosina

La miosina es la proteína miofibrilar más abundante de los filamentos gruesos, constituyendo el 43 % de la proteína miofibrilar y el 26 % de toda la proteína muscular (Pérez-Chabela y col., 2000a). Posee un peso molecular de aproximadamente 470 kDa, conteniendo dos cadenas polipeptídicas idénticas, con un alto contenido en estructura alfa helicoidal. La molécula contiene dos cabezas globulares que son responsables de la actividad enzimática (ATPasa) y de su capacidad para interactuar con la actina durante la contracción muscular. Las cabezas globulares contienen el extremo amino terminal de las dos cadenas polipeptídicas que conforman la molécula (Xiong, 1994).

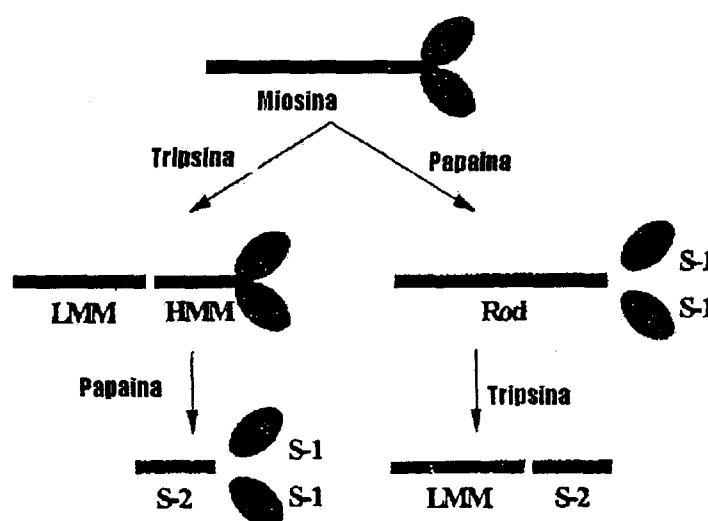


Figura 2: Diagrama de la miosina y sus subfragmentos (Visessanguan y col., 2000)

Asociadas con cada cabeza globular existen dos cadenas ligeras, de modo que a cada molécula de miosina se asocian cuatro cadenas ligeras. Estas cadenas son de dos clases químicamente diferentes. Una comprende las cadenas ligeras DTNB (18 kDa), así llamadas porque se separan mediante el tratamiento de la miosina con el reactivo para tioles DTNB (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico). Se sugiere que estas cadenas participan en la regulación por el calcio de la activación del músculo. A las cadenas ligeras del segundo tipo

se les denomina cadenas ligeras alcalinas, porque se liberan bajo estas condiciones, son esenciales para la actividad ATPasa. Las cadenas ligeras alcalinas son heterogéneas, unas poseen un peso molecular de 25 kDa y las otras de 16 kDa (Hultin, 1993).

La miosina se escinde en la proximidad de la cabeza por determinadas enzimas proteolíticas, como la tripsina, dando origen a dos fracciones proteicas (figura 2). Una de éstas se denomina meromiosina ligera (150 kDa) y la otra, que contiene las estructuras globulares de la cabeza de miosina, meromiosina pesada (350 kDa). Al ser tratada la meromiosina pesada con papaina origina dos subunidades denominadas subfragmento 1 (S1, fracción globular) y subfragmento 2 (S2, fracción helicoidal) (Hultin, 1993).

3.2.1.1.2 Actina

La actina es la proteína más importante de los filamentos delgados y constituye el 22 % de las proteínas miofibrilares. Se encuentra en el músculo en su forma fibrilar, siendo la actina G (globular) la forma monomérica de la proteína, con un peso molecular de 43-48 kDa. A la fuerza iónica fisiológica y en presencia de magnesio, la actina G se polimeriza de manera no covalente para formar un filamento de doble hélice, insoluble, llamado actina F. La fibra de actina F presenta un diámetro de 6 a 7 nm y tiene una estructura repetida cada 35.5 nm (Hultin, 1993; Pérez-Chabela y col., 2000a).

3.2.1.1.3 Otras proteínas miofibrilares

La tropomiosina es una proteína constituida por dos cadenas polipeptídicas, con estructura α -helicoidal enrollada formando una hélice, representa el 5 % de las proteínas miofibrilares y tiene un peso molecular de 65-70 kDa (Xiong, 1994). Esta proteína se sitúa a lo largo de los filamentos de actina (Hultin, 1993, Pérez-Chabela y col., 2000a).

La troponina se aísla con frecuencia junto con la tropomiosina. Está formada por tres subunidades, denominadas troponina C (17-18 kDa), troponina I (20-24 kDa) y

troponina T (37-40 kDa). La troponina C es la subunidad responsable de la fijación del calcio y de la sensibilidad del proceso contráctil a este catión. La troponina I inhibe fuertemente la actividad ATPasa de la actomiosina y la troponina T funciona proporcionando un punto de asociación entre la troponina y la tropomiosina (Hultin, 1993).

Tabla 2: Proteínas miofibrilares del músculo esquelético

Proteínas	Peso Molecular (kDa)	Contenido (%)	Localización
Contráctiles			
Miosina	500	43	Banda A
Actina	43	22	Banda I
Reguladoras mayores			
Troponina	70	5	Banda I
Tropomiosina	33 x 2	5	Banda I
Reguladoras menores			
Proteína M	165	2	Banda A
Proteína C	135	2	Banda A
Proteína H	69	<1	Banda A
Proteína F	121	<1	Banda A
Proteína I	50	<1	Banda A
Proteína X	152	<1	Banda A
β-Actinina	35 + 32	<1	Final banda I
γ-Actinina	35	<1	Banda I (?)
Filamentos intermedios			
Desmina	53	1	Periferia de las miofibrillas
Vimentina	55	1	Entre discos Z
Conectina	2x10 ⁶	10	Unión A-I
Discos Z			
α-Actinina	95 x 2	2	Discos Z
Proteína Z	50	<1	Discos Z
Eu-actinina	43	<1	Discos Z
Proteína 34 K	34	<1	Discos Z
ABP (filamentina)	250 x 2	<1	Discos Z
Otras Proteínas			
Vinculina	130	<1	Sarcolema
Nebulina	800	3	Banda I
Paratropomiosina	34	<1	Unión A-I

(Maruyama y col., 1977)

La proteína C constituye aproximadamente el 3 % de la masa del filamento grueso. Se ha sugerido que la molécula de proteína C es una cadena polipeptídica única, de 140 kDa, que envuelve la superficie del filamento grueso, con su eje longitudinal situado en un

plano perpendicular al de dicho filamento. Esos anillos proteicos protegen al filamento, evitando su destrucción por las fuerzas de tensión o por las modificaciones de su entorno iónico (Hultin, 1993).

La α -actinina posee un peso molecular de 190 kDa, forma un complejo fuerte con la actina F y se encuentra solamente en el disco Z (Xiong, 1994). La β -actinina es una proteína dímera formada por dos polipéptidos de 32 kDa y 35 kDa. Esta proteína se liga a la actina F e inhibe la recombinación de la actina F fragmentada. Se localiza en el extremo libre de los filamentos delgados y puede ser que participe en la regulación de la longitud de estos filamentos (Hultin, 1993).

La titina y la nebulina forman parte de los filamentos longitudinales que conectan los filamentos gruesos y los delgados de un extremo al otro del sarcómero. La titina, encargada de la formación de los denominados filamentos T, se encuentra unida a las bandas A-I, línea Z, línea M, banda A y posiblemente a lo largo del sarcómero. La nebulina, responsable de la formación de los filamentos S, tiene un peso molecular de 800 kDa y se localiza en la banda I, posiblemente regulando la geometría de los filamentos delgados. Otra proteína que forma filamentos en la célula muscular es la desmina, quien une miofibrillas adyacentes en el disco Z y conecta las miofibrillas al citoesqueleto celular. Al lado de la desmina se encuentran otras proteínas, como la vimentina y la sinemina, de las cuales solo se sabe que sus pesos moleculares son de 58 y 220 kDa, respectivamente (Hultin, 1993).

3.2.1.2 Proteínas solubles

Las proteínas solubles de la célula muscular constituyen una porción muy significativa de su contenido proteico (aproximadamente del 26 % de las proteínas totales). La mayor parte de estas proteínas son enzimas, principalmente enzimas glucolíticas (hexoquinasa, aldolasa, piruvatoquinasa, entre otras), aunque también existen otras como las de la ruta de las pentosas (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, transcetolasa, transaldolasaribosa-5-fosfato cetoisomerasa, entre otras) y enzimas auxiliares, como la

creatinin cinasa y la AMP desaminasa (Hultin, 1993). También es hidrosoluble la mioglobina, que constituye el depósito de oxígeno de la célula muscular.

3.2.1.3 Proteínas del estroma

Algunos componentes de la célula muscular no son solubles en agua ni en soluciones salinas concentradas. En esta categoría se incluyen la colágena y la elastina. La colágena es especialmente rica en hidroxilisina e hidroxiprolina, siendo su estructura básica el monómero de tropocolágena, con un peso molecular de 300 kDa. La elastina es un componente menor del músculo y tejido conectivo (Hultin, 1993)

3.2.2 Composición lipídica de la carne

Los lípidos comprenden aproximadamente entre el 4 y 8 % del músculo fresco (Tabla 3). Los lípidos de los tejidos animales incluyen triglicéridos (98 % de los lípidos totales), fosfolípidos, ácidos grasos y otras sustancias solubles en grasas. El perfil de ácidos grasos en los bovinos está constituido principalmente por ácidos grasos saturados (45-49 %) y monoinsaturados (42-50 %). Los ácidos grasos más abundantes son el oléico (C18:1), palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0) (tabla 3) (Rhee, 1992).

Tabla 3: Composición de ácidos grasos de la grasa bovina

Ácido graso	g/100 g carne	%
Mirístico	0.17	3.11
Palmítico	1.42	25.96
Palmitoléico	0.24	4.39
Esteárico	0.74	13.53
Oléico	2.40	43.88
Linoléico	0.20	3.66
Linolénico	0.01	0.18
Araquidónico	0.03	0.54
Otros saturados	0.12	2.19
Otros monoinsaturados	0.12	2.19
Otros poliinsaturados	0.02	0.37

(Rhee, 1992)

La formación de ácidos grasos libres es el resultado de la actividad lipolítica, endógena o exógena, sobre triglicéridos, lo que ocasiona que la carne sea más susceptible a sufrir procesos oxidativos y con la consecuente producción de sustancias que generan efectos indeseables en las características sensoriales de la carne cruda (Johns y col., 1989; Hernández y col., 1998).

Se ha estudiado la producción de lipasas y los factores que la regulan en bacterias del género *Pseudomonas* (Adams y Brawley, 1981; McKellar, 1982; Gilbert y col., 1991; Kordel y col., 1991; Sugihara y col., 1992; Young Lee y Shick Rhee, 1993; Braun y col., 1999), bacterias lácticas (Papon y Talon, 1988 y 1989; Johansson y col., 1994; Kenneally y col., 1998a y 1998b; Braun y col., 1999) y *Brochothrix thermosphacta* (Papon y Talon, 1988 y 1989) en diferentes sustratos cárnicos.

Los productos de la hidrólisis de los ácidos grasos, o sus productos de oxidación secundarios (aldehídos y cetonas) han demostrado poseer actividad catalítica en el proceso de autooxidación de la oximioglobina (Lynch y Faustman, 2000). No obstante, permanece en discusión el mecanismo químico por el cual la oxidación lipídica incrementa la tasa de autooxidación del pigmento muscular. Algunos autores (Faustman y col., 1999; Lynch y Faustman, 2000) sugieren que este efecto prooxidativo se debe a la adhesión de los aldehídos (especialmente los de alto peso molecular) sobre la oximioglobina, alterando la estructura terciaria de la globina y predisponiendo a la molécula a un proceso de autooxidación. Por su parte, otros autores (Lanari y col., 1996; O'Grady y col., 2001) sugieren que los productos finales de la oxidación lipídica no son, por sí solos, promotores de la oxidación de la oximioglobina, sino que los radicales libres peróxido formados durante la oxidación de los lípidos son los que generan la acumulación de metamioglobina.

3.2.3 Composición de carbohidratos en la carne

El carbohidrato predominante en el músculo vivo es el glucógeno, la glucólisis postmortem lo convierte en ácido láctico. Otros hidratos de carbono importantes en la composición cárnica son la glucosa-6-fosfato, glucógeno y glucosa (Kauffman, 2001).

3.3 Microbiología de la carne

Los tejidos profundos de los animales faenados en condiciones de buenas prácticas de manufactura son estériles, desde el punto de vista práctico (Guerrero y Taylor, 1994; Rodríguez, 1996). Por ello, el perfil microbiológico de la carne fresca presentada a los consumidores es la suma de las aportaciones realizadas durante las operaciones de faena, almacenamiento, transporte y distribución (Marshall y Bal'a, 2001).

El estado sanitario de los animales, su piel, vísceras, materia fecal, microflora de la cavidad oral y las operaciones de faena son las fuentes potenciales de contaminación cruzada de la carne (Marshall y Bal'a, 2001). Para el caso de los bovinos, la fuente inicial de contaminación la constituye la piel del animal, por su exposición previa al agua, tierra y materia fecal, principalmente. Resultaría lógico suponer que el duchado previo de los animales reduciría la contaminación, aunque estudios recientes han rechazado esta hipótesis (Marshall y Bal'a, 2001).

Las operaciones de desollado y eviscerado son etapas críticas, en las que se requiere de operarios entrenados y buenas prácticas de manufactura para evitar que los microorganismos (alterantes y patógenos) de la piel y contenido gastrointestinal lleguen hasta la superficie de la canal (Marshall y Bal'a, 2001). La proliferación microbiana en la carne depende de numerosos factores, entre los que se incluyen la composición de la microbiota contaminante, la temperatura de almacenamiento, el pH, los nutrientes disponibles, el potencial de oxido-reducción y la atmósfera que rodea la carne (Marshall y Bal'a, 2001).

El crecimiento microbiano se produce en la fase acuosa que rodea al producto, por lo que las capas profundas se consideran estériles. Esto es debido a que incluso microorganismos altamente proteolíticos no son capaces de afectar la capa de tejido conjuntivo que rodea las fibras musculares (endomisio) (Gill y Penney, 1982). Las concentraciones de hidratos de carbono (especialmente glucosa y glucógeno) en la carne postrigor son bajas en comparación con las proteínas, disponibles en cantidades suficientes

para soportar el crecimiento de un gran número de microorganismos (Nychas y col., 1988). Una vez que la glucosa ha sido consumida, la microflora comienza a utilizar aminoácidos como fuente de energía, con la consiguiente producción de compuestos volátiles responsables de los cambios en el olor de la carne (Gill, 1976; Gill y Newton, 1980; Nychas y col., 1988).

Algunas bacterias, incluidas las del género *Pseudomonas*, producen amoníaco como resultado del metabolismo de aminoácidos, lo que ocasiona la elevación del pH durante la alteración cárnica (Marshall y Bal'a, 2001). Los microorganismos Gram negativos, que predominan durante la contaminación aeróbica de la carne son responsables, generalmente, de la producción de olores pútridos y sulfurosos (Nychas y col., 1988).

La descarboxilación de aminoácidos genera compuestos denominados aminas biogénicas. Son compuestos básicos nitrogenados, de bajo peso molecular, formados por la descarboxilación de aminoácidos o la aminación y transaminación de aldehídos y cetonas (Halász y col., 1994; Silla-Santos, 1996). Los precursores de las principales aminas biogénicas encontradas en la carne se presentan en la figura 3.

Los prerequisites necesarios para la formación de aminas biogénicas incluyen la disponibilidad de aminoácidos libres, la presencia de microorganismos descarboxilasa positivos y de condiciones necesarias para el crecimiento microbiano, la síntesis y el mantenimiento de la actividad de las descarboxilasas (Silla-Santos, 1996). La producción de aminas biogénicas en alimentos puede verse afectada por factores tales como temperatura (Chander y col., 1989), concentración de sales (Chander y col., 1989), presencia de carbohidratos fermentables, tensión de oxígeno, potencial redox y, fundamentalmente, pH (Silla-Santos, 1996; Bearson y col., 1997).

Ejemplos de bacterias con actividad descarboxilante incluyen representantes de los géneros *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Morganella*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Pediococcus*, entre otros (Halász y col., 1994).

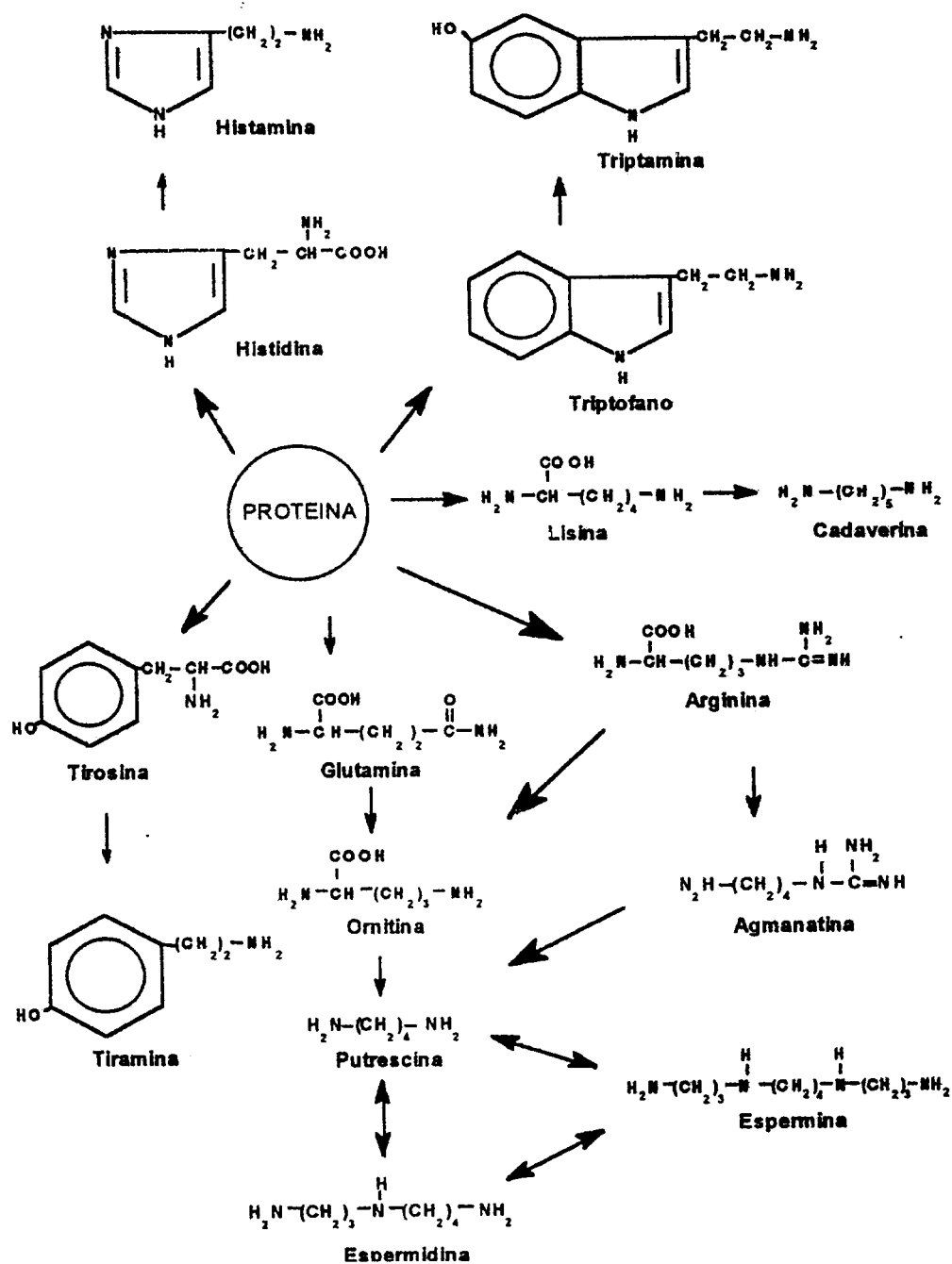


Figura 3: Rutas metabólicas para la formación de aminas biogénicas (Halász y col., 1994)

El consumo de aminas biogénicas por parte de individuos sanos no representa un riesgo, debido a que los sistemas de monoaminaoxidasa, diaminaoxidasa y poliaminaoxidasa logran detoxificarlas. Individuos con problemas coronarios o

respiratorios, o aquellos que presentan enfermedades que debilitan el sistema de aminooxidasas (alcoholismo, deficiencia de vitamina B₁₂, problemas gastrointestinales, entre otras), son sin embargo poblaciones de riesgo ante estas sustancias. La intoxicación genera náuseas, disneas respiratorias, palpitaciones cardíacas e hiper o hipotensión, entre otros signos característicos (Halász y col., 1994; Bardócz, 1995; Silla-Santos, 1996).

La determinación de aminas biogénicas en alimentos es importante no solo desde el punto de vista toxicológico, sino también porque estos compuestos pueden utilizarse como indicadores del grado de alteración de los alimentos. En carne fresca, recuentos elevados de putrescina, cadaverina y tiramina han sido relacionados con concentraciones elevadas de *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae* y bacterias lácticas, respectivamente (Edwards y col, 1985 y 1987; Dainty y col., 1986; Guerrero-Legarreta y Chávez-Gallardo, 1991; Eerola y col., 1996; Masson y col, 1996).

Las principales bacterias alterantes de la carne son Gram negativas e incluyen representantes psicrótrofos de *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* y de la anaerobia facultativa *Alteromonas putrefaciens*. Sin embargo, las bacterias lácticas y *Brochothrix thermosphucta* se encuentran también en elevadas concentraciones en la carne fresca (Campbell y col., 1979; Greer, 1988; Garriga y col., 1996).

Son numerosos los factores que influyen sobre el tipo y la tasa de crecimiento microbiano en los productos cárnicos, pudiéndose dividirlos en intrínsecos (contenido de nutrimentos, pH, actividad de agua y potencial redox) y extrínsecos (temperatura, humedad y tensión de oxígeno) (Greer, 1988).

El músculo postmortem ofrece un ambiente altamente nutritivo a la microflora contaminante, pudiendo satisfacer sus necesidades básicas para el crecimiento. No obstante, a pesar de su abundancia en proteínas y lípidos, no representa una fuente de nutrimentos fácilmente aprovechable (Greer, 1988).

Los sustratos más importantes para el crecimiento bacteriano en el músculo son la glucosa, glucosa-6-fosfato, ácido láctico y aminoácidos. En la carne fresca, estos componentes constituyen menos del 2 % de la composición química total (Lawrie, 1977). Todas las bacterias de mayor relevancia como deteriorantes de la carne muestran una preferencia inicial por la glucosa. Prueba de ello es que la síntesis de enzimas bacterianas con actividad proteolítica permanece reprimida hasta que son agotados los componentes solubles de menor peso molecular y más rápidamente asimilables dentro del músculo (Greer, 1988). Por lo expuesto, la desnaturalización de las proteínas musculares se produce después de un prolongado almacenamiento, en el momento en que la densidad bacteriana excede valores de 10^7 UFC/gramo de músculo (Greer, 1988; Prandl y col., 1994).

La durabilidad de las carnes presenta una correlación directa con el pH que posean las mismas. En la carne postmortem, éste parámetro está influenciado por la cantidad de ácido láctico producido a partir del glucógeno durante la glucólisis anaerobia. El pH de la carne proveniente de un animal descansado es de aproximadamente 5.6-5.7 (Hultin, 1993). Cuando por el contrario, el nivel de glucógeno antemortem es bajo (producto de situaciones estresantes o animales agotados), el nivel de ácido láctico producido es inferior a lo normal y el pH final de la carne oscila entre 6 y 6.5. Si se considera que el pH óptimo para el crecimiento bacteriano se encuentra próximo a la neutralidad, es fácil deducir que este tipo de carnes estará más predisuesto al ataque bacteriano.

La actividad de agua en los alimentos es otro factor importante que condiciona el crecimiento microbiano. En la carne fresca este parámetro presenta un valor de aproximadamente 0.99 y, por lo tanto, en función de esta característica la carne es susceptible de alteración por parte de las principales especies microbianas (Libby, 1986; Prandl y col., 1994).

El potencial redox (capacidad oxidante o reductora de un sistema) limita el crecimiento microbiano, produciendo un aumento de la fase de latencia. En la carne, los microorganismos aerobios se ven favorecidos en su crecimiento por un potencial redox

alto, mientras que un potencial redox bajo favorece el desarrollo de microorganismos anaeróbicos (Lawrie, 1977; Prandl y col., 1994).

La temperatura es probablemente el principal factor ambiental considerado individualmente, que influye en el crecimiento de bacterias sobre la carne. Las especies psicrótrofas (especialmente *Pseudomonas* spp. y algunas enterobacterias) prevalecen en la carne cuando se mantienen en refrigeración (0-4°C). Bajo estas condiciones, se produce un aumento de la fase de latencia y una disminución de la tasa de crecimiento microbiano (Zamora y Zaritzky, 1985; Greer, 1988; Prandl y col., 1994; Garriga y col., 1996). Aunque, el almacenamiento de la carne a bajas temperaturas retrasa el crecimiento bacteriano y extiende la vida útil del producto, la medida en la cual la tasa de crecimiento decrece con las menores temperaturas varía con las especies de microorganismos presentes.

Cuando la temperatura a la que se somete la carne alcanza los 20 °C, las pseudomonas se constituyen en el grupo microbiano predominante, siendo los microorganismos alteradores predominantes encontrados en las carnes que han sufrido un abuso térmico. Cuando la temperatura asciende hasta 30°C, representantes de *Acinetobacter* y las enterobacterias son las bacterias que prevalecen (Greer, 1988; Prandl y col., 1994).

La humedad es otro factor extrínseco que influye sobre el desarrollo bacteriano en la carne. El crecimiento de los microorganismos en la superficie cárnica es diez veces mayor cuando la carne está húmeda que sobre la superficie seca almacenada a una temperatura de 2-3 °C (Lawrie, 1977; Prandl y col., 1994)

La tensión de oxígeno presente durante el almacenamiento de la carne influye sobre el tipo de microorganismos que prevalecerán. Mientras que en condiciones de aerobiosis son *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella* y *Flavobacterium* los géneros que exhiben un desarrollo superior, en la carne envasada al vacío o en atmósferas modificadas prevalecerá la flora Gram positiva, especialmente bacterias lácticas y *Brochothrix thermosphacta* (Campbell y col., 1979).

Las bacterias ácido lácticas sólo representan una pequeña proporción de la microflora inicial en la carne envasada al vacío. No obstante, de modo progresivo llegan a representar hasta un 70-90% de la población microbiana presente. Algunos estudios realizados y que analizan la flora existente en este tipo de atmósferas, demuestran que se favorece el crecimiento de enterobacterias, *Brochothrix thermosphacta*, *Alteromonas putrefaciens* y bacterias ácido lácticas (Egan y Shay, 1982; Hitchner y col., 1982; Blickstad y Molin, 1983; Nassos y col., 1983; Hotchkiss, 1988; Schoebitz y col., 1990; Greer y Jones, 1991).

3.4 Seguridad de la carne

El desarrollo tecnológico en el procesamiento y la conservación de los alimentos ha proporcionado a los consumidores una gran selección de alimentos con una elevada vida útil. Consecuentemente, los compradores de carne han sido más conscientes de la calidad y más selectivos.

El procesador primario debe emplear métodos para asegurar la calidad de la carne durante el procesamiento, distribución y venta de la misma a los minoristas o consumidores.

De los numerosos métodos de procesamiento físico y químico disponibles para extender la vida útil de la carne, la refrigeración es el método más importante de los utilizados por la industria cárnica. Sin embargo, en la carne fresca refrigerada pueden crecer una serie de microorganismos alterantes como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, ciertas enterobacterias y *Brochothrix thermosphacta*, además de *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Carnobacterium* y *Leuconostoc* (Aymerich y Hugas, 1998).

El envasado al vacío es tal vez el método más común de modificar el ambiente interno del envase y es utilizado extensivamente por la industria cárnica. La extensión de la vida de anaquel de las carnes envasadas al vacío radica en los cambios que se producen en las concentraciones de O₂ y CO₂ dentro del envase, generándose una selección microbiana.

Como resultado de ellos, se inhibe el crecimiento de especies aeróbicas (especialmente *Pseudomonas*), mientras se tornan predominantes algunas especies de *Lactobacillus* y *Brochothrix thermosphacta* (Nassos y col., 1983; Hotchkiss, 1988; Schoebitz y col., 1990; Greer y Jones, 1991). Mediante este tratamiento la vida comercial del producto se prolonga en forma considerable, entre un 50 y un 400% (Garriga y col., 1996).

Los microorganismos muestran la mayor tolerancia a un factor ambiental adverso simple cuando las otras condiciones son óptimas. De forma contraria, dos o más condiciones subóptimas del ambiente que actúen simultáneamente ejercerán un efecto inhibitorio mucho mayor que cada una de ellas consideradas de forma separada (“concepto de obstáculos”) (Hugas, 1998).

Es de destacar que el efecto colateral indeseable de una determinada barrera individual puede ser evitada o reducida al requerirse una menor intensidad en la misma cuando se utilizan dos o más obstáculos en forma conjunta para el control de la proliferación microbiana.

3.4.1 Fermentación láctica como medio de conservación

La biopreservación puede definirse como la extensión de la vida útil e incremento de la seguridad sanitaria de los alimentos mediante la microflora natural o sus metabolitos (Aymerich y Hugas, 1998; Hugas, 1998). Puede ser aplicada en los alimentos, en general, y en las carnes, en particular, a través de cuatro métodos básicos:

- 1.- Adición de cultivos bacterianos viables. El éxito en la protección dependerá de la capacidad del cultivo bacteriano para crecer en las condiciones ambientales del alimento y las originadas por los procesos tecnológicos. No debe producir cambios sensoriales y debe ser capaz de crecer competitivamente, en caso de abuso de temperatura
- 2.- Adición de cultivos bioprotectores productores de bacteriocinas.
- 3.- Mediante licores de fermentación o sus concentrados procedentes del crecimiento de bacterias lácticas en medios complejos.

4.- Como sustancia purificada o semipurificada.

Los alimentos han sido conservados por acción de las bacterias ácido lácticas desde mucho antes que existiera la ciencia de la Microbiología. Históricamente, la preservación por fermentación láctica era un proceso empírico por el cual los alimentos crudos sufrían cambios que resultaban en alimentos con características y calidades diferentes. Probablemente, la leche fermentada por acción bacteriana ha sido consumida desde hace al menos 11,000 años (Daeschel, 1989; Hugas, 1993; Fields, 1996; Stiles, 1996).

Microbiológicamente, las bacterias ácido lácticas se caracterizan por ser Gram positivas, comúnmente no móviles, no esporuladas y por producir ácido láctico como producto principal o único del metabolismo fermentativo. Crecen de manera anaerobia, sin embargo, la mayor parte de ellas no son sensibles al oxígeno (anaerobios aerotolerantes). La mayor parte de este grupo sólo puede obtener energía del metabolismo de los carbohidratos y compuestos relacionados. Según su metabolismo, pueden diferenciarse en homofermentadoras (producen virtualmente un único producto de fermentación, el ácido láctico) y heterofermentadoras (producen otros productos, en particular etanol, ácido acético y CO₂) (Brock y Magigan, 1993; Larpent, 1995; Caplice y Fitzgerald, 1999).

Las bacterias ácido lácticas que crecen en la carne fresca causan interferencia con el crecimiento de microorganismos alterantes y patógenos mediante diferentes mecanismos como la competencia por nutrientes, oxígeno, competición por la adhesión al sustrato y/o por la producción de una amplia gama de sustancias inhibitorias, principalmente ácido láctico o acético, diacetilo, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y otras sustancias de bajo peso molecular (por ejemplo ácido benzóico, metilidantoina y mevalonolactona) (Selgas y col., 1993; Aymerich y Hugas, 1998; Hugas, 1998; Niku-Paavola y col., 1999). Al no poder esterilizarse la carne antes de aplicar este tipo de microorganismos, éstos deben ser altamente competitivos frente a la microflora nativa (Pérez-Chabela y col. 2000b).

Las bacteriocinas pueden definirse como compuestos de naturaleza proteica, biológicamente activos y que exhiben propiedades antimicrobianas sobre otras bacterias,

generalmente relacionadas filogenéticamente con el organismo productor (Bruno y Montville, 1993). Son pequeños péptidos catiónicos (30 a 60 residuos aminoácidos) con un alto punto isoeléctrico y características anfipáticas (Jack y col., 1995; Nes y col., 1996; Uteng y col., 2002).

Las bacteriocinas pueden ser agrupadas de acuerdo a semejanzas en distintas propiedades, como secuencia primaria de aminoácidos, modificaciones químicas, propiedades fisico-químicas, actividad antimicrobiana, entre otras. Una de las clasificaciones más aceptada es la siguiente (Klaenhammer, 1988; Jack y col., 1995; Nes y col., 1996; Hugas, 1998):

* Clase I: lantibióticos. Son pequeños péptidos que se diferencian por contener deshidroaminoácidos o aminoácidos tioeter (lantionina y 3-metillantionina). Se han establecido dos subgrupos en base a sus estructuras: el tipo A comprende moléculas anfipáticas, con pesos moleculares de 2,164 a 3,488 Da y de 2 a 7 cargas netas positivas, y el tipo B consiste en moléculas más globulares, con pesos moleculares de 1,959 a 2,041 Da, sin carga neta.

* Clase II: bacteriocinas termoestables, con pesos moleculares inferiores a 10 kDa, no lantibióticos. Se dividen en tres subclases en base a diferencias en sus secuencias N-terminal, la formación de poros en la membrana plasmática de las bacterias sensibles o el requerimiento de grupos funcionales sulfhidrilos.

- Clase IIa: péptidos simples con actividad frente a *Listeria*.

- Clase IIb: bacteriocinas que requieren de dos péptidos para ser activas.

- Clase IIc: péptidos que requieren la reducción de residuos de cisteína para ser activos.

* Clase III: grandes moléculas con pesos moleculares superiores a los 30 kDa, termosensibles. En este grupo se incluyen ciertas enzimas extracelulares bacteriolíticas (hemolisinas y muramidasa) cuyo significado fisiológico se asemeja al de las bacteriocinas.

* Clase IV: bacteriocinas complejas que contienen lípidos o carbohidratos adicionados al péptido.

Las bacteriocinas más estudiadas son las de clase I y II, debido a que son las más abundantes, termorresistentes y estables a un amplio rango de pH, por lo que pueden ser utilizadas industrialmente (De Vuyst y Vandame, 1994).

El mecanismo de acción antibacteriano resulta relativamente común para todas las bacteriocinas estudiadas hasta el momento. El sitio primario de acción se encuentra en la membrana celular de las bacterias sensibles, a las que se adhieren de manera específica o no específica. Una vez allí forman un poro y provocan el flujo de K^+ hacia el exterior celular, resultando en un cambio en las cargas eléctricas a través de la membrana y provocando la disipación inmediata del potencial de membrana. El gradiente de pH (más alcalino en el interior) también se disipa por la actividad de determinadas bacteriocinas, contribuyendo a anular el potencial de membrana. Las defensas celulares intentan recuperar los iones perdidos y, para ello, utilizan sistemas de transporte a nivel de membrana dependientes del ATP, lo que resulta en una rápida hidrólisis del mismo. Seguidamente, y como consecuencia de la pérdida del potencial de membrana y el agotamiento del ATP, se produce el cese del crecimiento y la posterior muerte celular (Stevens y col., 1991; Bruno y Montville, 1993; Abee y col., 1994; Verheul y col., 1997; McAuliffe y col., 1998; Moll y col., 1999).

No existe información precisa acerca del modo de acción de las bacteriocinas que no contienen lantionina, pero se sabe que tienen una rápida acción desestabilizadora sobre la membrana citoplasmática de las células sensibles que puede provocar la lisis o estallido celular (Pérez-Chabela y col., 2000b).

Se ha demostrado que la actividad de las bacteriocinas depende del pH del medio donde se encuentren (actividad óptima a pH bajos), de la temperatura (disminuyen su actividad al disminuir la temperatura, posiblemente como resultado de cambios experimentados a nivel de la membrana celular bacteriana) y de sus concentraciones (Ahn y Stiles, 1990; Biswas y col., 1991; Okereke y Montville, 1991; Raccach, 1992; Hugas y col., 1995; Aymerich y col., 1996; Hugas, 1996; Contreras y col., 1997).

La actividad de las bacteriocinas también se ve influenciada de forma negativa, por la presencia de iones (especialmente Ca^{++} y Mg^{++}), los cuales ocuparían los sitios de unión de las bacteriocinas en las membranas celulares (Biswas y col., 1991). La adición simultánea de bacteriocina y algún agente quelante (como por ejemplo el EDTA) incrementa la sensibilidad bacteriana, extendiendo el espectro de acción a bacterias Gram negativas como *Salmonella* spp. (Stevens y col., 1991).

Se ha descrito la aplicación de cepas productoras de bacteriocinas como agentes bioprotectores en un gran número de estudios (Ahn y Stiles, 1990; Guerrero-Legarreta y col., 1995; Guidolin Milani y col., 1998; Hugas, 1998; Roos y col., 1999).

Además de evaluar el efecto de estos cultivos sobre microorganismos alterantes, también se ha estudiado el efecto sobre patógenos cárnicos. Así, se comprueba la eficacia de determinadas bacteriocinas para inhibir la germinación de esporas de *C. botulinum* en productos cárnicos sometidos a refrigeración (Okereke y Montville, 1991). En este mismo sentido, se ha evidenciado la potencialidad de las cepas bacteriocinogénicas para actuar como biopreservantes en carnes frescas y productos cárnicos, antagonizando el crecimiento y desarrollo de *Listeria monocytogenes* (Schillinger y col., 1991; Skytta y col., 1993; Winkowski y col., 1993; Hugas y col., 1995; Aymerich y col., 1996; Hugas, 1996; Monfort y col., 1996).

3.4.2 Conservación mediante ácidos orgánicos

El ácido láctico es el principal metabolito producido por las bacterias ácido lácticas homofermentativas. Es uno de los ácidos con mayor distribución en la naturaleza y el más empleado con fines preservantes (Hugas, 1993; Larpent, 1995). Es incoloro, no volátil, muy soluble en agua y con un pK_a de 3.857 (van der Marel y col., 1988).

Su aplicación más importante es como descontaminante de canales de cerdo, vacuno y pollo, incrementando la estabilidad microbiológica de las carnes envasadas al vacío (Busta, 1982; Nassos y col., 1985; Zamora y Zaritzky, 1987(a); Zamora y Zaritzky,

1987(b); van der Marel y col., 1988; Anderson y Marshall, 1989; Mendonca y col., 1989; Anderson y Marshall, 1990; Unda y col., 1990; Brewer y col., 1991; Dixon y col., 1991; Greer y Jones, 1991; Lamkey y col., 1991; Papadopoulos y col., 1991). No solo el ácido láctico es empleado como sanitizante en carnes, los ácidos acético, propiónico y sórbico son otros ejemplos.

Los productos descontaminantes deben reunir ciertas propiedades para ser utilizadas en alimentos: poseer actividad bactericida fuerte y rápida, no dejar residuos que puedan afectar al consumidor, no afectar las características organolépticas y ser aceptado por el público consumidor (van der Marel y col. 1988).

Se han postulado diferentes teorías para describir el mecanismo por el cual los ácidos orgánicos ejercen su efecto bactericida. El que mayor consenso tiene es el que postula que el ácido orgánico, en su estado no disociado, atraviesa por difusión la membrana celular bacteriana favorecido por su carácter lipofílico. Una vez en el interior celular, que presenta un pH superior al exterior, el ácido se disocia con el objetivo de restablecer el equilibrio (disociado/no disociado), liberando al medio grupos H^+ y acidificando el medio. La bacteria, con el objetivo de restablecer la homeostasis, agota su energía activando los mecanismos para eliminar los grupos ácidos hacia el exterior celular. Junto con el agotamiento energético, la acidificación del citoplasma bacteriano provocaría la competencia con co-enzimas, la inactivación enzimática (especialmente la de aquellas que posean grupos S-S en su estructura) (Busta, 1982) o la supresión de la oxidación del fumarato en microorganismos catalasa +, entre otras acciones (Smulders y col., 1986; Young y Foegeding, 1993; Shelef, 1994).

Otra teoría establece que la incorporación de importantes cantidades de lactato al interior bacteriano modifica el equilibrio termodinámico de la reacción por la cual el piruvato es reducido a lactato, invirtiéndola y de este modo inhibiendo la ruta metabólica más importante de los microorganismos anaerobios (Shelef, 1994).

La generación de energía en algunos microorganismos (*Streptococcus faecalis*, por ejemplo) está acoplada con la transferencia transmembranal del lactato. Al hallarse concentraciones importantes del mismo en el exterior celular, se inhibiría este transporte y, por ende, se desacoplaría la generación de ATP, provocando el agotamiento energético celular (Papadopoulos y col. 1991).

Los ácidos hidroxicarboxílicos como el cítrico, láctico, málico y tartárico poseen actividad quelante sobre ciertos cationes (Young y Foegeding, 1993). Se presume que esta actividad quelante (especialmente sobre el Fe) es la causante de la actividad antilisteria (Shelef, 1994).

Bajo las mismas condiciones (especialmente de pH) existen diferencias en la actividad antimicrobiana de los diferentes ácidos orgánicos, lo que sugiere un efecto específico relacionado con la potencia para penetrar en la célula, la parte celular que es atacada y la naturaleza química del ataque (Moon, 1983; Mendonca y col., 1989; Unda y col., 1990).

La eficacia del tratamiento con ácidos orgánicos depende de los siguientes factores:

1.- Grado y naturaleza de la contaminación inicial: altas concentraciones microbianas iniciales están correlacionadas con escasa actividad antimicrobiana (Smulders y col. 1986). Se ha demostrado que la sensibilidad de los hongos y levaduras al tratamiento ácido es inferior al bacteriano (Moon, 1983). Asimismo, se ha determinado que *Listeria monocytogenes* es más resistente a la acción del ácido láctico que las enterobacterias, siendo éstas a su vez más resistentes que *Salmonella thyphimurium* y *Campylobacter jejuni* (Van Netten y col., 1994).

2.- pH: la actividad antimicrobiana es ejercida por la forma no disociada del ácido, gracias a su característica lipofílica. El grado de disociación del ácido está relacionado con el pK_a del mismo y, obviamente, con el pH del ambiente. Por ello, cuanto más cercano esté el pH del medio al pK_a de la molécula de ácido orgánico, mayor cantidad de ácido no

disociado estará disponible para ejercer su efecto antibacteriano (Smulders y col. 1986; Van Netten y col., 1994). En estudios realizados con ácido sórbico (Zamora y Zaritzky, 1987b), se ha determinado que la forma no disociada es 45 veces más efectiva que la disociada.

3.- Temperatura: se ha demostrado que la actividad antibacteriana de las moléculas de ácidos orgánicos es mayor a temperaturas de 35°C que a temperaturas de refrigeración (Van Netten y col., 1994).

4.- Otros: la concentración de ácido presente está relacionada directamente con su actividad antimicrobiana (Smulders y col. 1986), así como el tiempo de exposición del mismo con el material a descontaminar (Van Netten y col., 1994).

En experimentos en los que se usaron concentraciones del 2-3% de lactato como agente sanitizante se observó una disminución del recuento de microorganismos mesófilos aeróbicos totales, enterobacterias y psicotofos. Además se observó reducción en las tasas de crecimiento para patógenos como *Escherichia coli* (Dixon y col., 1991), *Campylobacter jejuni* (Cudjoe y Kapperud, 1991), *Clostridium botulinum* (Maas y col., 1989), *Listeria monocytogenes* (Young y Foegeding, 1993) y *Salmonella* spp. (Smyser y Snoeyenbos, 1978; Dixon y col., 1991). Por otra parte, se evidenció una modificación en la flora predominante, estando constituida en un 76 y 95% por bacterias lácticas (especialmente *Leuconostoc* spp. y *Lactobacillus* spp.) cuando la carne se almacena en condiciones de aerobiosis o anaerobiosis respectivamente (Nassos y col., 1985).

La aplicación de ácido láctico en una concentración no mayor del 2% (v/v) no modifica el color de la carne ni de la grasa (Smulders y col., 1986). Resultados similares fueron obtenidos por diferentes autores (Greer y Jones, 1991; Maca y col., 1995 y 1997a) utilizando el tratamiento con ácido láctico sobre carne bovina y determinando el color por métodos instrumentales (Hunter Lab) o sensoriales. Brewer y col. (1991) y Lamkey y col. (1991) observaron un efecto "protector" del ácido láctico sobre el color rojo de la carne de cerdo almacenada a 4 °C, manifestado por un aumento de la relación 630/580 de los valores obtenidos en el espectro de reflectancia. Los estudios realizados en carne caprina

(Borpuzari y Borpuzari, 1995) indican que porcentajes menores al 0.75% no producen efectos sobre el color, determinado de forma sensorial.

El ácido láctico, en concentraciones no superiores al 2%, no produce modificaciones en el aroma de la carne tratada (Smulders y col., 1986; Lamkey y col., 1991). En este sentido, se observó también que el tratamiento con ácido láctico disminuía la aparición de sabores residuales en carne bovina almacenada bajo refrigeración durante cuatro semanas (Maca y col., 1995 y 1997b). Aplicando a carne caprina concentraciones de ácido láctico no superiores al 1% tampoco se altera el sabor de la carne tratada (Borpuzari y Borpuzari, 1995). La lipooxidación de las grasas se vio reducida cuando la carne de bovino y cerdo fue tratada con ácido láctico (Brewer y col., 1991; Maca y col., 1997b).

Con respecto a las características de textura; ni dureza, fracturabilidad, cohesividad o elasticidad se modificaron cuando la carne bovina fue tratada con soluciones de ácido láctico al 2% (Maca y col., 1995 y 1997b).

El L(+) ácido láctico ha sido reconocido como no tóxico por la FAO/OMS desde 1967, tolerándose concentraciones superiores a 1,500 mg/Kg (Smulders y col., 1986). La legislación internacional es poco clara sobre el empleo del ácido láctico como biopreservante en carnes: países como Bélgica y Alemania autorizan su uso; Francia, Luxemburgo, Holanda y Nueva Zelanda lo prohíben y países como Argentina, Estados Unidos y Australia, entre otros, no toman ninguna decisión al respecto (Smulders y col., 1986).

3.5 Propiedades funcionales

Si bien el papel primordial de las proteínas como alimentos es suministrar al consumidor aminoácidos indispensables para el mantenimiento y desarrollo de los tejidos corporales, la aceptabilidad del alimento por parte del consumidor se basa en atributos sensoriales como el color, apariencia, sabor y textura, donde las proteínas imparten tales atributos (Damodaran, 1994).

La “funcionalidad”, se refiere a todas las propiedades del alimento o de sus ingredientes, excepto las nutricionales, que condicionan su utilidad e influyen sobre su utilización o como contribuyente directo en los atributos del alimento (Hall, 1996).

El papel funcional de las proteínas en la calidad sensorial de los alimentos no es consecuencia de una propiedad fisicoquímica simple, sino la manifestación de una compleja interacción de propiedades múltiples (Damodaran, 1994).

Tabla 4: Funcionalidad de las proteínas en sistemas alimenticios

Función	Mecanismo
Solubilidad	Hidrofilia, capacidad de retención de agua.
Viscosidad	Puentes de H, hidratación.
Gelificación	Entrampamiento de agua e inmovilización, formación de una red tridimensional.
Cohesión / adhesión	Hidrofobicidad, puentes iónicos y de H.
Elasticidad	Uniones hidrofóbicas, puentes disulfuro.
Emulsificación	Adsorción en interfases, formación de películas
Unión de aromas y grasa	Uniones hidrofóbicas.
Formación de espumas	Adsorción en interfases, formación de películas

(Damodaran, 1994)

Las propiedades funcionales más relevantes de las proteínas en los sistemas alimenticios se muestran en la tabla 4. Éstas están relacionadas con sus propiedades fisicoquímicas y estructurales, como su composición y secuencia aminoacídica, distribución de cargas, hidrofobicidad e hidrofilia, estructura secundaria, terciaria y cuaternaria y número de dominios estructurales, por ejemplo. Muchas de las propiedades fisicoquímicas están directamente relacionadas con la secuencia de aminoácidos, ya que son los responsables de la estructura tridimensional y, por lo tanto, de la estabilidad térmica, patrón de distribución de cargas en la superficie molecular, distribución de segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos y de la topografía de la superficie de las proteínas (Damodaran, 1994).

Adicionalmente a los factores moleculares intrínsecos, factores externos como los métodos de extracción, pH, fuerza iónica, potencial redox del sistema, así como la

interacción con otros componentes del alimento afectan a la funcionalidad proteica. No obstante, estos efectos extrínsecos son simples manifestaciones de las alteraciones conformacionales y de otras propiedades fisicoquímicas de las proteínas involucradas (Damodaran, 1994).

3.5.1 Color

El color es una sensación subjetiva, resultado de una compleja serie de respuestas fisiológicas y psicológicas a la radiación electromagnética de longitudes de onda comprendidas en el intervalo de 400-700 nm (Pérez-Álvarez y col., 1998). La característica más importante por la cual se juzga la calidad de un alimento es su apariencia y el atributo más importante de la apariencia es el color.

El color de la carne y los productos cárnicos es dependiente de las reacciones químicas de los pigmentos mioglobina y hemoglobina de las células musculares y residuos de la sangre, respectivamente. La mioglobina es una proteína soluble en agua localizada en las células musculares, variando su concentración según la especie animal y estando sus valores para los bovinos comprendidos entre 2 y 5 mg/g (Livingston y Brown, 1981). La molécula de mioglobina puede definirse estructuralmente como una proteína globular muy compacta, bastante ordenada y plegada específicamente, enlazada a un grupo hemo (Acton y Dawson, 1994).

La globina está constituida por 153 residuos aminoácidos, con un tamaño de 3.6 nm y un peso molecular de 16.9 kDa. Su estructura está constituida por 8 segmentos relativamente rectos, separados por curvaturas ocasionadas por la presencia en la cadena de prolina y otros aminoácidos que no forman hélices alfa (como serina e isoleucina). La molécula de globina es incolora y contribuye a la estabilidad del complejo hemo, a través de aproximadamente 20 residuos aminoácidos que por medio de enlaces hidrofóbicos, puentes de H y puentes salinos lo embeben en un hueco hidrofóbico, protegiéndolo de la acción de otros grupos químicos. Esto ocurre salvo cuando la estructura terciaria de la

molécula es modificada por acción del calor o de tratamientos ácidos (Livingston y Duane Brown, 1981; Acton y Dawson, 1994; Hargrove y col., 1996; Konermann y col., 1997).

El grupo hemo está constituido por una estructura anular orgánica compleja, la protoporfirina, a la que se halla unido un átomo de hierro. Este átomo posee 6 enlaces de coordinación, cuatro de ellos los establece con la molécula plana de la protoporfirina, el quinto ligando lo establece con la histidina 93 de la globina y el sexto enlace de coordinación está abierto y actúa como sitio de unión a la molécula de oxígeno (figura 4) (Acton y Dawson, 1994).

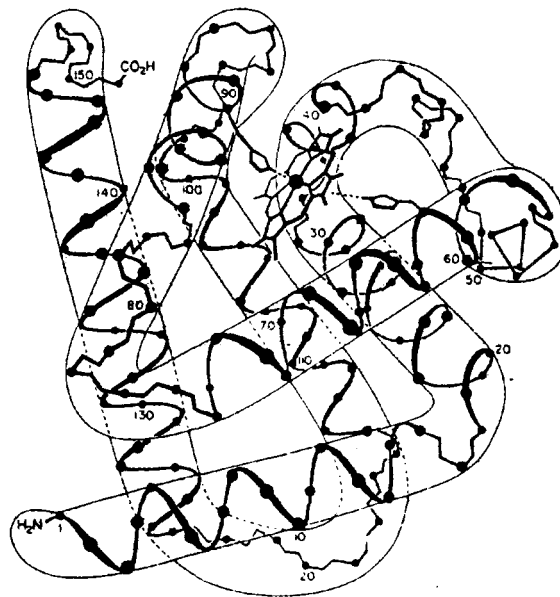


Figura 4: Estructura de la mioglobina (Badui, 1999)

La globina, llamada también apomioglobina, pierde aproximadamente el 20% de su estructura helicoidal luego de ser removido el grupo hemo, siendo entonces sumamente sensible a la desnaturalización. La estructura helicoidal se recupera al recombinarse con la protoporfirina (grupo hemo sin el átomo de hierro), sugiriendo que el átomo de hierro no es esencial para la conformación tridimensional de la mioglobina (Solberg, 1970).

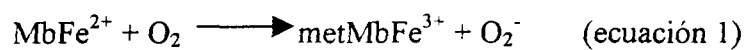
La función de la mioglobina es almacenar oxígeno en la célula muscular, lo que permite al músculo realizar reacciones metabólicas a tasas mucho mayores que las que podría desarrollar con solo el aporte de oxígeno vía circulación sanguínea. Para ello utiliza el sexto enlace de coordinación del hierro en estado ferroso (Fe^{++}), uniendo de forma reversible el oxígeno. Cuando esta unión ocurre, el color de la mioglobina cambia de púrpura a rojo brillante (Collman y Fu, 1999).

El sexto enlace de coordinación del hierro no es, sin embargo, específico para el oxígeno, aunque existen algunas limitaciones en cuanto a las moléculas que pueden establecer uniones con el hierro de la mioglobina: el espacio remanente dejado por la globina estructurada en torno al grupo hemo es pequeño y, por ende, sólo pequeñas moléculas pueden penetrar. Además, sólo moléculas que puedan inducir bajos estados energéticos son capaces de formar complejos estables. Tres ligandos de importancia para la carne cumplen estos requisitos: oxígeno, óxido nítrico y monóxido de carbono (Young y West, 2001).

Cuando el hierro se encuentra en estado férrico (Fe^{3+}), la alta carga del hierro une electrones de forma más fuerte e impide la donación de electrones imprescindibles para ligar la molécula de oxígeno (Livingston y Brown, 1981). Por esta razón, la mioglobina en estado férrico (denominada metamioglobina) no puede ligar oxígeno, aunque sí una molécula de agua. En el animal vivo, la NADH-citocromo b_5 oxidoreductasa reduce la metamioglobina a su estado ferroso y previene la acumulación de metamioglobina (Shikama, 1998). En la carne postmortem la oxidación del hierro debe evitarse, ya que el color marrón que se origina hace a la carne poco atractiva para los consumidores (Young y West, 2001). La actividad metamioglobina reductasa se localiza predominantemente en la superficie mitocondrial (Arihara y col., 1995). La enzima requiere NADH como reductor y citocromo b_5 como un mediador de la transferencia de electrones. Su actividad muestra un máximo a pH de 6.4-6.5, disminuyendo bruscamente a pHs por debajo de 6 (Young y West, 2001).

La reacción de formación de metamioglobina a partir de oximioglobina (mioglobina oxigenada) es denominada “autooxidación”, debido a que ocurre con la oximioglobina como única especie reactiva. Comparada con la tasa de reacción de la mioglobina con el oxígeno, que es de segundos, la tasa de autooxidación a pHs fisiológicos se mide en horas, ya que presenta una barrera energética superior (Shikama, 1998).

El mecanismo completo de la autooxidación se encuentra aún bajo debate, pero estudios recientes indican que, en una primera etapa, la oximioglobina se descompone en su estado férrico y se produce un radical superóxido. La reacción simplificada quedaría de la siguiente manera (Shikama, 1998):



La presión parcial de oxígeno representa un factor que modifica la tasa de autooxidación, siendo ésta máxima a una presión de 1.5 mm de mercurio, lo que corresponde a la concentración requerida para extraer el 50% de mioglobina saturada con oxígeno (Shikama, 1998; Young y West, 2001).

La tasa de autooxidación es también dependiente del pH, siendo máxima a valores de 5.5 y disminuye marcadamente cuando el pH asciende por sobre valores de 6. El incremento de la tasa de autooxidación por la disminución en el pH puede interpretarse como una consecuencia de la protonación del complejo $\text{Fe}^{2+} (\text{O}_2)$ para formar la especie ácida $\text{Fe}^{2+} (\text{HO}_2^+)$, que rápidamente se disocia en Fe^{3+} y H_2O . En este esquema, la histidina distal de la globina serviría como protección al complejo $\text{Fe}^{2+} (\text{O}_2)$ a pH neutro mediante la formación de un puente de hidrógeno para unir el oxígeno y bloquear el ingreso de moléculas de agua. Cuando el puente de H se pierde la especie inerte es convertida fácilmente a su forma protonada, dando lugar a una formación muy rápida de metamioglobina (Shikama, 1998).

Al incrementar la temperatura, la tasa de reacción de autooxidación se incrementa de forma paralela. Una disminución en la temperatura desde 22 °C a -2 °C se traduce en una disminución de 40 veces la tasa de autooxidación (Young y West, 2001).

El color se asocia, pues, con el propio alimento pero también con los tratamientos tecnológicos o procesos degradativos que sufre el mismo. Esta propiedad nos permite valorar de forma rápida la calidad de muchos alimentos y en su medición se basan numerosas normas oficiales de control de calidad. El ojo humano está capacitado para apreciar pequeñas diferencias de color; sin embargo esta determinación subjetiva presenta graves inconvenientes para su empleo: no es reproducible y la nomenclatura utilizada es confusa (Pérez- Álvarez y col., 1998).

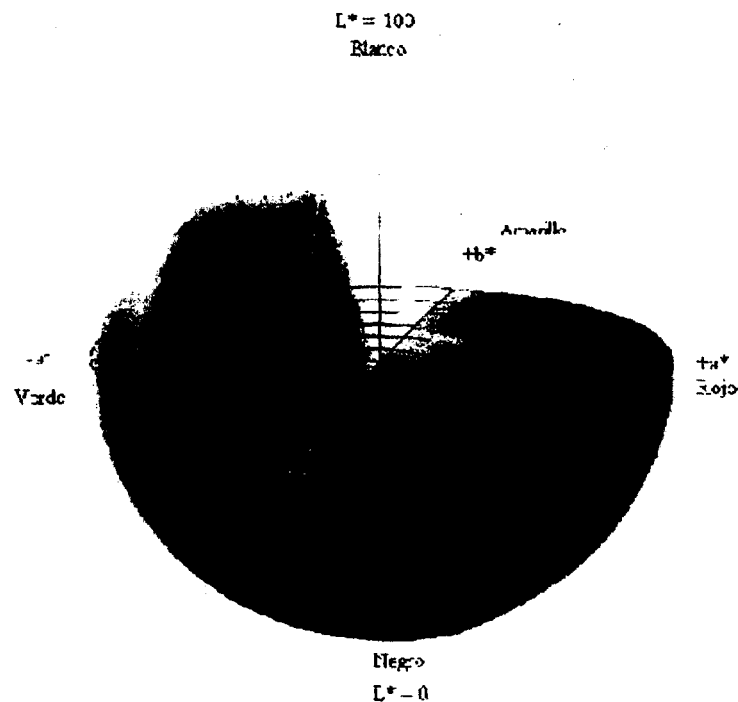


Figura 5: Sólido de color $L^* a^* b^*$

La medición objetiva (instrumental) del color está basada en un sistema tridimensional esférico del color, definido por tres coordenadas colorimétricas adimensionales: L^* , a^* y b^* (figura 5). L^* es la medición de la luminosidad donde 0 equivale al negro y 100 al blanco. Las coordenadas colorimétricas ($a^* b^*$) forman un plano

perpendicular a la luminosidad. La coordenada a^* define la desviación del punto acromático correspondiente a la claridad, hacia el rojo si es positiva y hacia el verde si es negativa. Por su parte, la coordenada b^* define la desviación hacia el amarillo o hacia el azul si es positiva o negativa, respectivamente. La tonalidad es el arcotangente (b^*/a^*) y determina la rotación sobre los ejes a^* y b^* . La cromaticidad es la medición de intensidad del color y se calcula como $(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ (Little, 1975; Pérez-Álvarez y col., 1998). Cassens y col. (1995) definieron un método de referencia para preparar muestras, fuente de luz, geometría de la iluminación, ángulo del observador y otros parámetros que deben especificarse para que los datos sean reproducibles y comparables con otras fuentes.

Por su parte, un objeto puede absorber (o por el contrario reflejar) una parte o la totalidad de la luz que recibe. La proporción de luz que refleja puede variar según la longitud de onda de la luz incidente, debido a que los pigmentos absorben más a unas determinadas longitudes de onda que a otras, de esta forma un objeto puede caracterizarse por su espectro de reflexión (Pérez-Álvarez y col., 1998). Los espectros de reflexión obtenidos para los diferentes estados del pigmento cárnico se muestran en la figura 6 (Young y West, 2001). Se puede observar que a una longitud de onda de 630 nm hay un valor de reflectancia máximo para la oximioglobina y mínimo para la metamioglobina. Por el contrario, a 580 nm se invierten y el máximo % de reflectancia le corresponde a la metamioglobina y el mínimo a la oximioglobina.

Utilizando el cociente (o la diferencia) entre los porcentajes de reflectancia a longitudes de onda de 630 y 580 nm se pueden obtener "índices" que permiten establecer el seguimiento de los cambios en el color de la carne fresca, presentando estos índices una buena correlación con la aceptabilidad del consumidor y evitando la alteración de la muestra (Eagerman y col., 1978; Hunt, 1980; Pérez-Álvarez y col., 1998).

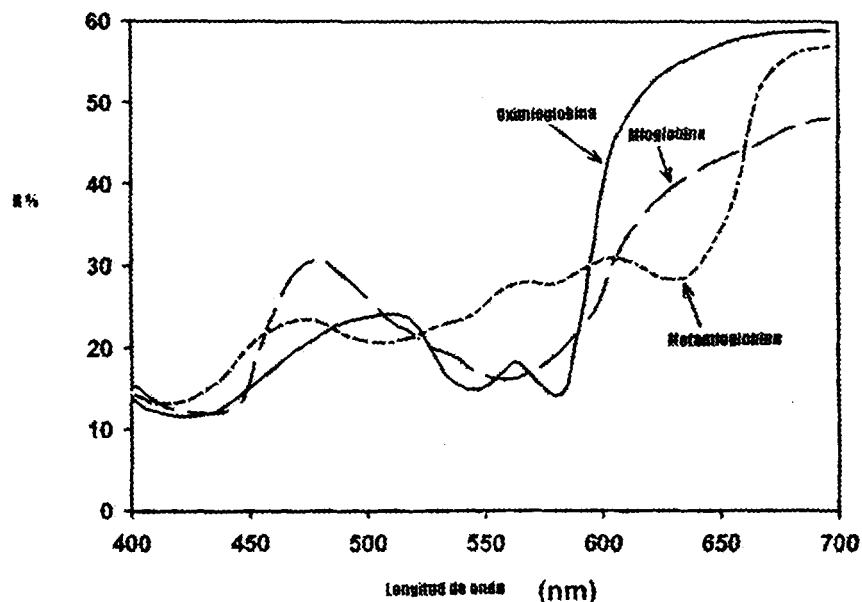


Figura 6: Comparación de los espectros de reflectancia para soluciones de mioglobina, oximioglobina y metamioglobina (Young y West, 2001)

3.5.2 Solubilidad

La solubilidad puede ser definida como el porcentaje total de proteína muscular que permanece en solución bajo condiciones específicas y que no es sedimentable bajo fuerzas moderadas de centrifugación. Por lo tanto, representa un estado de equilibrio entre el soluto (proteína) y el disolvente (Xiong, 1994). La solubilidad de las proteínas cárnicas es probablemente la propiedad funcional más importante, por la influencia que representa sobre otras propiedades físicas (Hall, 1996).

La solubilidad de las proteínas está relacionada con la hidrofobicidad superficial (interacciones proteína-proteína) y su hidrofilia (interacción proteína solvente). Las propiedades superficiales de las proteínas son el resultado de la composición en aminoácidos, la distribución de éstos y la flexibilidad de la molécula. La proporción

relativa de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos en la superficie molecular dictará el grado de solvatación (Hall, 1996).

La conformación proteica está determinada por el ambiente de solvatación. En solución, las cadenas de aminoácidos están afectados por fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. Para minimizar la energía libre de estabilización, los aminoácidos hidrofílicos se orientan hacia la superficie molecular y la mayoría de los aminoácidos hidrofóbicos se exponen al interior de la molécula (Vojdani, 1996).

El pH del ambiente influye marcadamente sobre la solubilidad proteica, ya que en ambiente acuoso las proteínas tienden a poseer una carga neta de 0 en las proximidades de su punto isoeléctrico. En este punto las proteínas presentan su menor solubilidad debido al incremento de las interacciones proteína-proteína en detrimento de su interacción con el agua. A pHs alejados del punto isoeléctrico, la proteína adquiere carga positiva o negativa y aumentan las interacciones del agua con las cargas de la proteína. La repulsión generada en la molécula proteica contribuye al incremento de la solubilidad y la estabilidad en solución. A pHs extremos (ácidos o básicos) la proteína puede perder su plegamiento y exponer de esta forma grupos hidrofóbicos. Esta desnaturalización por valores bajos o altos de pH ocurre por una disminución en las uniones electrostáticas (Hultin, 1993; Vojdani, 1996).

Para algunas proteínas el incremento en la concentración de sales aumenta la solubilidad, ya que estas interactúan con grupos cargados opuestos de la proteína para formar una doble capa de grupos iónicos. De esta forma disminuyen las interacciones electrostáticas entre las moléculas proteicas. Superada cierta concentración límite de sales la solubilidad decrece, debido a que en este punto existe una competencia entre la proteína y la sal por el agua, incrementándose las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas proteicas (Wismer-Pedersen, 1994).

La solubilidad normalmente está en función de la concentración de proteína: a altas concentraciones, parte de las proteínas se insolubilizan y precipitan bajo centrifugación (Hall, 1996).

3.5.3 Propiedades de emulsificación

Una emulsión es un conjunto de al menos dos líquidos inmiscibles, uno disperso (fase dispersa o interna) en el otro (fase continua o externa) en forma de gotas finas (Das y Kinsella, 1990). En alimentos, los materiales que generalmente forman emulsiones son el agua y el aceite o grasa inmiscibles. Si el aceite es la fase dispersa y el agua la continua la emulsión se denomina aceite en agua (por ejemplo las mayonesas), aunque también se presentan emulsiones agua en aceite (por ejemplo la mantequilla). Las emulsiones representan una forma aceptable, en términos de apariencia y palatabilidad, para productos alimenticios, ayudan a regular la textura y permiten incorporar ingredientes hidro y liposolubles (Flores y Bermell, 1985; Das y Kinsella, 1990).

La energía requerida para que una molécula pueda ser solubilizada en agua es aproximadamente igual a la energía de los puentes de H entre las moléculas de agua que deben romperse para solubilizar dicha molécula. Este proceso ocurre siempre que la interacción entre el agua y la molécula a disolver sea más favorable que la interacción entre las propias moléculas de agua. Para moléculas no polares, la energía libre de transferencia desde un disolvente no polar al agua es positiva. El resultado de este proceso es un incremento en las uniones puente de H, impartiendo mayor estructura al sistema y minimizando el contacto con la sustancia no polar; de esta forma se logra reducir al mínimo la tensión en la interfase (Cameron y col., 1991; Mangino, 1994).

El factor crítico en la formación de una emulsión depende de la aplicación de agentes emulsionantes, cuya función es reducir la energía libre asociada a la dispersión de finas gotas de aceite en agua. Los agentes emulsionantes son moléculas anfipáticas, por lo que una parte de la molécula es soluble en agua y la otra soluble en disolventes no polares (Cameron y col., 1991; Mangino, 1994).

Muchas proteínas pueden ser añadidas a las emulsiones con el objetivo de ayudar en su formación e incrementar su estabilidad, causando una disminución pronunciada en la tensión superficial (Nakai, 1983). En su estado nativo, la mayor parte de los aminoácidos hidrofóbicos componentes de la cadena proteica se localizan en el interior de la molécula, exponiendo la proteína hacia el agua los grupos cargados (Mangino, 1994). Siendo moléculas anfipáticas, las proteínas tienden a orientarse hacia la interfase polar-no polar, debiendo alcanzar la misma para poder exhibir su funcionalidad (al igual que ocurre con los otros agentes emulsionantes).

Cuando ocurre el desplegamiento de la molécula proteica en la interfase agua-aceite, los grupos hidrofóbicos se insertan en la fase lipídica, ocurriendo la reacción de forma espontánea por su baja energía de activación, al perderse algo de la energía conformacional y de hidratación de las proteínas. En la interfase, las proteínas pierden su plegamiento en diversos grados, se reorientan y rearreglan (Das y Kinsella, 1990). Los residuos hidrofóbicos ingresarán al ambiente no polar, siempre y cuando no existan grupos cargados en la proximidad y forman una película cohesiva continua. La probabilidad de que los grupos hidrofóbicos de la proteína se retiren de la interfase agua-aceite es inversamente proporcional al número de puntos de adhesión y a la flexibilidad proteica (Nakai, 1983; Mangino, 1994). El grado de desplegamiento de la proteína está directamente relacionado con la distribución de los grupos hidrofóbicos, mientras que, en apariencia, el contenido de uniones covalentes S-S y el dominio α -hélice no tienen efecto sobre este fenómeno (Phillips, 1981; Das y Kinsella, 1990).

Los factores que afectan a las propiedades emulsionantes de las proteínas son: la cinética de adsorción a la interfase, la disminución de la tensión en la misma, la reología de la película cohesiva y la hidrofobicidad superficial de las proteínas (Das y Kinsella, 1990).

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables. Los principales procesos de desestabilización de una emulsión son el cremado, la floculación, la coalescencia y la maduración de Ostwald (Das y Kinsella, 1990; Cameron y col., 1991).

Debido a que la densidad de la mayoría de los aceites es menor que el agua, existe siempre la tendencia de la fase oleosa a concentrarse en la superficie de las emulsiones. La tasa de cremado (v) depende del radio del glóbulo (d), de la diferencia de densidad entre el aceite y la fase acuosa ($\Delta\rho$) y de la viscosidad (η) del medio. Se expresa por medio de la ecuación de Stokes:

$$v = \Delta\rho g d^2 / 18\eta \quad (\text{ecuación 2})$$

siendo g la fuerza de gravedad (Das y Kinsella, 1990; Hill, 1996).

De acuerdo con esta ecuación, la velocidad de cremado puede reducirse al disminuir la diferencia de densidad entre las fases, al reducir el tamaño del glóbulo o al incrementar la viscosidad de la fase continua (Cameron y col., 1991). La tasa de cremado es dependiente de la fracción de la fase dispersa, siendo baja en emulsiones concentradas y constituyendo un problema tecnológico para fases dispersas poco concentradas (Das y Kinsella, 1990; Mangino, 1994; Hill, 1996).

La floculación se define como el proceso por el cual dos o más glóbulos se agregan, sin pérdida de su identidad, por la existencia de una fuerza neta de agregación entre los glóbulos. Este fenómeno puede prevenirse al incorporar una barrera eléctrica que genere repulsión entre los glóbulos. La floculación ocurre en presencia de macromoléculas que actúan como emulsionantes, formándose uniones entre los glóbulos y generándose una extensa red de glóbulos interconectados que incrementan la viscosidad de la emulsión (Damodaran y Anand, 1997). La floculación de las emulsiones depende de la proteína utilizada y de condiciones de la solución, como pH y fuerza iónica. En las emulsiones que contienen sales la barrera de repulsión eléctrica disminuye y facilita la floculación (Das y Kinsella, 1990; Mangino, 1994; Hill, 1996).

Si las fuerzas atractivas entre los glóbulos son tan grandes como para mantenerlos muy cercanos entre sí y fallan los estabilizantes, acontece la coalescencia. Las cargas residuales sobre la superficie de los glóbulos lipídicos generan una repulsión entre ellos y favorecen la estabilidad de la emulsión. Estas fuerzas pueden interactuar a través de interacciones dipolo-dipolo y generar que los glóbulos se aproximen entre sí. Estas son

fuerzas débiles pero causan coalescencia cuando la distancia de separación es pequeña; el proceso disminuye la superficie interfacial de la emulsión y por tanto la energía superficial. La coalescencia es la principal causa de inestabilidad de las emulsiones, origina la ruptura de la película interfacial y es irreversible. La tasa de coalescencia disminuye al incrementar la carga neta sobre el glóbulo, la viscosidad del sistema y la elasticidad de la película en la interfase y, también, al disminuir el tamaño del glóbulo (Das y Kinsella, 1990; Mangino, 1994; Hill, 1996).

La maduración de Ostwald se relaciona con el transporte difusional de material desde glóbulos pequeños hacia otros más grandes, fenómeno que se sugiere que acontece en emulsiones con lípidos de diferente punto de fusión. La tasa de transporte es directamente proporcional a la concentración de emulsionante libre, ya que presumiblemente sirven como transportadores de lípidos. Si la maduración de Ostwald ocurre, el diámetro promedio de los glóbulos tiende a incrementarse. En emulsiones estabilizadas por proteínas éste es un proceso de bajo impacto sobre la estabilidad de la emulsión (Das y Kinsella, 1990; Mangino, 1994; Hill, 1996).

La estabilidad de una emulsión depende, además de los factores anteriormente mencionados, de la capacidad de la proteína para acceder rápidamente a la interfase y formar una película viscoelástica en ella. La formación de esta película depende de interacciones no covalentes, uniones por puentes de H; interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y covalentes (puentes S-S) entre las moléculas de proteína adsorbidas (Damodaran y Anand, 1997).

Para actuar como un emulsionante ideal las proteínas deben presentar, pues, una serie de propiedades: alta hidrofobicidad superficial, limitada tendencia a la agregación, suficiente hidrofilia para mantenerse en solución en un amplio intervalo de pH, alta capacidad de absorción y capacidad para reducir la tensión de la interfase, buena y balanceada distribución de los dominios hidrofóbicos e hidrofílicos a lo largo de la molécula, capacidad de formación de una película cohesiva en la interfase aceite-agua, alto grado de flexibilidad conformacional y alto grado de densidad de carga, preferencialmente

expuesta a la fase acuosa para crear una barrera de repulsión eléctrica y reducir el acercamiento y coalescencia de los glóbulos (Das y Kinsella, 1990; Damodaran y Anand, 1997).

Las emulsiones alimenticias se forman generalmente a temperaturas de 60 °C, ya que las interacciones de los grupos hidrofóbicos y las interacciones entre el emulsionante y los lípidos son óptimas a esa temperatura. La formación de emulsiones a la temperatura citada favorece las interacciones necesarias para garantizar la estabilidad de las mismas. Al disminuir la temperatura, el agua adquiere mayor estructura y, adicionalmente, la formación de cristales de hielo provoca daños físicos en la emulsión e incrementa la tasa de coalescencia (Mangino, 1994). Es importante destacar que la temperatura a la cual una proteína desarrolla sus mejores propiedades como emulsionante varía, siendo de alrededor de 45 °C para proteínas musculares (Li-Chan y col., 1985).

El pH de la emulsión es un criterio importante con respecto a la cantidad de proteína adsorbida en la interfase y, consecuentemente, en la estabilidad de la emulsión. Cuando el pH de la emulsión coincide con el punto isoelectrico de la proteína se forma una película más condensada, se incrementa la concentración de proteína en la interfase y se forma, consecuentemente, una película en la interfase más viscosa y elástica. La repulsión eléctrica de los glóbulos es mínima para valores de pH cercanos al punto isoelectrico, resultando en una menor estabilidad de la emulsión (Yamauchi y col., 1980; Phillips, 1981; Das y Kinsella, 1990; Mangino, 1994).

La interacción de las proteínas con los lípidos es hidrofóbica por naturaleza, por lo que un examen de la naturaleza hidrofóbica de la proteína es de ayuda para predecir su capacidad emulsionante. De todas formas la emulsificación está más fuertemente relacionada con la accesibilidad de los grupos hidrofóbicos a la superficie que con el número total de grupos hidrofóbicos presentes en la molécula (Nakai, 1983; Mangino, 1994).

Se ha observado que, dentro de determinados intervalos (35-95%), la solubilidad no es el factor principal que determina la capacidad de una proteína como emulsionante. No obstante, la proteína debe interactuar con otras moléculas y ser capaz de dispersarse en la fase continua (Nakai, 1983; Li-Chan y col., 1985; Mangino, 1994).

Los productos cárnicos elaborados en forma de pasta fina se consideran emulsiones del tipo aceite en agua, en las que las proteínas actúan como agentes emulsionantes. La hidratación de las proteínas influye sobre la estabilidad de la emulsión, al formar una matriz cohesiva y viscosa en la cual son englobadas e inmovilizadas las partículas de grasa (Flores y Bermell, 1985; Barbut, 1994).

En productos cárnicos emulsionados las proteínas miofibrilares tienen las propiedades funcionales más eficientes y ayudan a estabilizar la emulsión en mayor grado que las restantes proteínas cárnicas (Totosaus y col., 1998). Según estudios realizados por Galluzzo y Regenstein (1978), la miosina presenta las mejores propiedades emulsionantes, mientras que la actina genera películas con partículas gruesas (no finamente globulares).

Si bien se ha sugerido que emplear proteínas en emulsiones a un pH cercano a su punto isoeléctrico genera una película más condensada e incrementa su concentración en la interfase, la capacidad de emulsión de las proteínas miofibrilares se reduce a medida que el pH de la solución se acerca al punto isoeléctrico de la miosina. Una disminución similar en la capacidad de emulsificación se observa al disminuir la concentración de sal desde 0.3 a 0.1 M (Galluzzo y Regenstein, 1978; Flores y Bermell, 1985; Li-Chan y col., 1985).

La hidrofobicidad e hidrosolubilidad de las proteínas cárnicas son importantes parámetros que afectan a las propiedades de emulsificación. Para muestras con alta solubilidad (superior al 50 %), la hidrofobicidad es el parámetro más importante que afecta la capacidad de emulsificación. Para muestras poco solubles es la hidrosolubilidad el factor crítico (Voutsinas y col., 1983; Li-Chan y col., 1984).

3.5.4 Propiedades de gelificación

La formación de un gel puede describirse como un fenómeno de agregación en el cual las fuerzas atractivas y repulsivas se encuentran balanceadas para formar una red tridimensional capaz de retener gran cantidad de agua. Si las fuerzas atractivas predominan se forma un coágulo, en donde la red es desordenada y el agua no es retenida (Matsumura y Mori, 1996).

La gelificación inducida por calor ha sido simplificada por Ferry en 1948, definiéndola como un proceso de dos etapas que involucra el desplegamiento de la molécula proteica seguido por la agregación de las proteínas para formar una red de interconexiones entre las cadenas (Ziegler y Acton, 1984; Smith, 1994; Matsumura y Mori, 1996). Este modelo de gelificación es válido para proteínas con dominios simples, como la ovoalbúmina, α -lactoalbúmina, lisozima o β -lactoglobulina (Smith, 1994).

En las proteínas cárnicas, la miosina es la molécula proteica responsable de la mayor parte de las propiedades de gelificación. Esta proteína contiene dominios múltiples (entendiéndose por dominios estructurales las regiones, de aproximadamente 200 aminoácidos, que pueden considerarse como independientes una de otras), dominios que son capaces de desplegarse independientemente de los otros dominios, aún dentro de la misma molécula (Smith, 1994). Mediante calorimetría diferencial de barrido se determinó la existencia de 10 dominios estructurales en la molécula de miosina (Smyth y col., 1996; Vega-Warner y Smith, 2001) (Figura 7).

La molécula de actina, por su parte, no es capaz de formar una red tridimensional al ser sometida a calentamiento. No obstante, en presencia de miosina se visualiza un efecto sinérgico y de complementación con la capacidad de unión evidenciada por la miosina. Una buena relación miosina/actina es esencial para el desarrollo de un gel rígido (Sano y col., 1989; Barbut, 1994; Boyer y col., 1996). Los geles obtenidos a partir de miosina sola muestran los mayores valores de rigidez y los preparados con miosina con pequeñas cantidades de actina presentan el mayor grado de elasticidad (Sano y col., 1989). La

tropomiosina y la troponina, por el contrario, no presentan un papel activo en la gelificación inducida por calor de la actomiosina (Ziegler y Acton, 1984; Jiménez-Colmenero y col., 1994; Lan y col., 1995a).

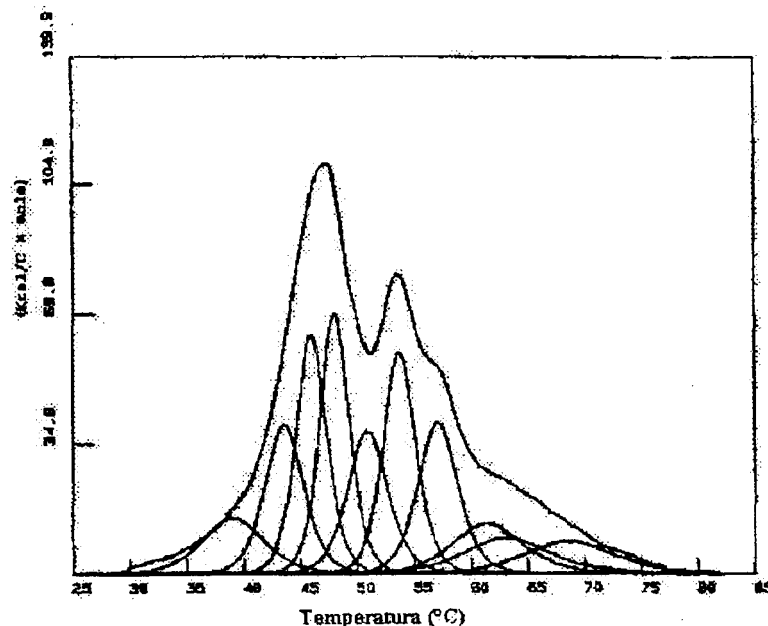


Figura 7: Calorimetría diferencial de barrido para miosina (Smyth y col., 1996)

La capacidad para formar geles es mayor para el caso de la miosina intacta, seguida a continuación por la porción de la cola de la molécula y finalmente por las cabezas globulares (S1) (Samejima y col., 1981). Las cadenas pesadas de la miosina son las responsables de la gelificación inducida por calor de dicha proteína, siendo escasa la contribución de las cadenas ligeras (Sano y col., 1990a). Las cadenas alcalinas ligeras son menos estables que las del tipo DTNB pero no forman agregados, lo que sugiere que las cadenas ligeras no son formadoras de redes tridimensionales tipo gel. Morita y Ogata (1991) reportaron que la cadena ligera de miosina DTNB muestra una tendencia marcada a la agregación, evidenciando un papel importante en la unión de la miosina y la actina. Asociándose con las cadenas pesadas de miosina, las cadenas ligeras influyen sobre la estabilidad térmica y el perfil de agregación de la miosina (Sano y col., 1990a; Sano y col., 1990b; Chan y col., 1993; Smyth y col., 1996).

El desarrollo de la desnaturalización de la miosina es muy complejo, estando cada transición térmica asociada con una región discreta de la molécula. Por ello, dicho desarrollo es interpretado en términos de las diferentes estabilidades térmicas intrínsecas de cada región: la porción de la cola de la miosina es el principal subfragmento asociado con la gelificación, la meromiosina ligera y el subfragmento S1 son los responsables de la desnaturalización y agregación térmica a temperaturas por debajo de 55 °C y el subfragmento S2 se desnaturaliza y agrega encima de dicha temperatura (Sano y col., 1990a; Sano y col., 1990b; Chan y col., 1993; Tazawa y col., 2002).

La formación de enlaces S-S en la región S1 de la molécula de miosina contribuye a la creación de una matriz tridimensional en un rango de temperaturas de 45-55 °C (Samejima y col., 1981), debido posiblemente a que la cabeza globular posee 12 ó 13 de los 42 grupos tioles (SH) presentes en la molécula de miosina (Smyth y col., 1998). Arriba de los 55 °C, los enlaces disulfuro son menos importantes para la gelificación de la miosina. La cola de la miosina (meromiosina ligera y S2) es posiblemente la responsable de la formación del gel a dichas temperaturas, vía interacciones hidrofóbicas y puentes de H (Smyth y col., 1998; Visessanguan y col., 2000).

Es importante controlar el proceso de desnaturalización para obtener las características de gel deseadas, ya que es un proceso o secuencia en el cual el arreglo espacial de las cadenas polipeptídicas dentro de las moléculas cambia desde las condiciones de la proteína nativa hasta un arreglo mucho más desordenado. Este proceso no engloba eventos excluyentes y constituye un proceso continuo en varias áreas de la molécula proteica, cambiando a diferentes velocidades. La estructura intacta de la miosina permite que cada dominio estructural se despliegue paso por paso y refleje la naturaleza cooperativa de la transición. Las propiedades de gelificación de la miosina están altamente correlacionadas con la longitud de la porción de α -hélice de la molécula (Visessanguan y An, 2000).

La gelificación de proteínas miofibrilares es pH dependiente, observándose mayor fuerza de gel a pH de 6-6.5 (Ishiroshi y col., 1979; Samejima y col., 1981; Ziegler y Acton,

1984; Flores y Bermell, 1986; Xiong, 1992; Lan y col., 1995b). El efecto del pH sobre la rigidez de estos geles, podría atribuirse a las modificaciones en la asociación proteína-proteína, resultado del balance de fuerzas electrostáticas y de otras uniones. La contribución de estas uniones/interacciones para cada molécula proteica presente en los geles depende del grado de desdoblamiento proteico, el cual también está afectado por el pH (Xiong, 1992).

La fuerza del gel generada por proteínas miofibrilares disminuye de forma paralela a la disminución en la fuerza iónica desde 0.6 M a 0.1 M de NaCl. La adición de fosfatos incrementa la rigidez del gel formado (Samejima y col., 1985; Flores y Bermell, 1986). La entalpía de desnaturalización de las proteínas miofibrilares muestra una tendencia a disminuir conforme aumenta la concentración de NaCl. Esto sugiere que la adición de sales disminuye la estabilidad de la actina y miosina, posiblemente modificando la distribución de cargas en la superficie molecular y, por ende, las interacciones electrostáticas que estabilizan a la molécula nativa (Sano y col., 1990b). La adición de fosfatos, por su parte, también desestabiliza la molécula de miosina (menor entalpía de desnaturalización), posiblemente mediante uniones de naturaleza electrostática con la miosina (especialmente con el fragmento S1), lo que resulta en cambios estructurales que facilitan el desplegamiento de la proteína. Mediante análisis reológicos dinámicos, la adición de sales y fosfatos modifican el módulo de almacenamiento (G'), probablemente como consecuencia de alteraciones en las cinéticas de desnaturalización y agregación, partes fundamentales del proceso de gelificación (Samejima y col., 1985; Liu y Xiong, 1997). Samejima y col. (1985) indican que la rigidez del gel es proporcional a la solubilidad proteica, aunque otros autores (Xiong, 1992; Liu y Xiong, 1997) no consideran a la solubilidad como el único parámetro a considerar.

Bajas tasas de calentamiento permiten un mayor tiempo para que las proteínas se desplieguen, interactúen entre ellas y establezcan una matriz más rígida (Camou y col., 1989; Barbut y Mittal, 1990). Altas tasas de calentamiento posiblemente favorecen una rápida asociación de las moléculas proteicas y, como resultado, la interacción proteína-proteína ocurre en una forma menos ordenada, favoreciéndose los procesos de nucleación y

crecimiento (Foegeding y col., 1986; Jiménez-Colmenero y col., 1994; Lefevre y col., 1998). Para una velocidad determinada de desnaturalización, cuánto más pequeñas sean las fuerzas de atracción entre las cadenas de proteína desnaturalizada más lento será el segundo proceso. De esta forma, la proteína libre desnaturalizada se acumulará como un intermediario en el curso de la gelificación y se obtendrá una red de gel más fina (Ziegler y Acton, 1984; Liu y col., 1996).

El módulo de almacenamiento (G') es un índice de la rigidez del material, pero no de la elasticidad del mismo (Barbut y Mital, 1989). Para medir la elasticidad de los geles se utiliza el cociente entre el módulo de pérdida y el módulo de almacenamiento (tangente $G''/G' = \delta$). Este término representa cuánta energía es almacenada y recuperada en cada ciclo de deformación (componente G') y cuánta energía se pierde en cada ciclo por disipación viscosa (componente G'') (Stanley y col., 1996). Para un cuerpo perfectamente elástico el esfuerzo está en fase con la deformación ($\delta = 0^\circ$), por lo que toda la energía es almacenada y recuperada. Para un cuerpo perfectamente viscoso (Newtoniano), el esfuerzo está totalmente fuera de fase y toda la energía se disipa viscosamente ($\delta = 90^\circ$) (Stanley y col., 1996; Visessanguan y col., 2000).

4 Objetivos

1. General

Estudiar las modificaciones en la carne bovina sometida a tratamientos ácidos para extender su vida útil y la funcionalidad de las proteínas miofibrilares de carne roja bovina sujeta a dichos tratamientos y su posible cambio estructural.

2. Específicos

* Evaluar el efecto de los tratamientos ácidos sobre el pH, grupos sulfhidrilos, gelificación, solubilidad, emulsificación y color de la carne bovina.

* Determinar el efecto inhibitorio de los tratamientos ácidos sobre microorganismos de descomposición.

* Estudiar el efecto de la conservación ácida sobre la formación de ácidos grasos libres de cadena larga y la producción de aminas biogénicas.

* Evaluar el efecto de la conservación ácida sobre la degradación de proteínas contráctiles mayores (miosina y actina) y su ultraestructura.

**MATERIALES
Y
MÉTODOS**

5. Materiales y Métodos

5.1 Obtención de las muestras

Las muestras fueron obtenidas a partir del músculo *Psoas mayor* de bovino, 6 a 7 horas transcurridos desde la matanza y evisceración. No se consignaron datos sobre la raza, sexo y edad de los animales o condiciones previas. Con el objeto de minimizar la población microbiana inicial, la superficie cárnica fue flameada y tratada bajo estrictas condiciones de esterilidad. La carne fue molida en una moladora doméstica (Moulinex, México DF, México) previa sanitización de las superficies de contacto con la muestra por medio de alcohol etílico y flameado de la cuchilla. Finalmente se dividió la carne en porciones de 50 gramos, aplicándoseles los tratamientos que se describen a continuación.

5.2 Preparación de inóculos

5.2.1 Bacterias alterantes

Las bacterias alterantes utilizadas en la presente tesis fueron: *Pseudomonas fluorescens* B52, *Brochothrix thermosphacta* NCIB-10018 (Queen's University, Belfast, R.U) y *Lactobacillus minor* 119B.

Pseudomonas fluorescens B52 (fluoresceína +) es una bacteria proteolítica aislada en nuestro laboratorio. Presenta actividad proteolítica en medio con gelatina y caseína, así como sobre miosina, actina, titina y filamentina (Richardson, 1982; Alanís y col., 1999). No presenta actividad lipolítica *in vitro*, utilizando la metodología reportada por Braun y col. (1999) con tributirina como sustrato. No evidencia tampoco actividad aminodescarboxilasa *in vitro*, utilizando las técnicas reportadas por Niven y col. (1981) y Paulsen y col. (1996).

Brochothrix thermosphacta NCIB-10018 (Queen's University, Belfast, R.U), es un microorganismo comúnmente encontrado en carnes almacenadas bajo anaerobiosis (Nychas y col., 1988), que presenta como característica importante el generar halos de lipólisis en agar tributirina (Braun y col., 1999). No evidencia actividad proteolítica *in vitro* (agar caseína), utilizando la técnica reportada por Alanís-García (1997), ni aminodescarboxilasa, empleando las técnicas de Niven y col. (1981) y Paulsen y col. (1996).

Lactobacillus minor 119B es una bacteria láctica heterofermentativa aislada por el Dr. Víctor Kuri y gentilmente cedida por la Queen's University, Belfast (Reino Unido). Este microorganismo no presenta actividad proteolítica, lipolítica o aminodescarboxilasa *in vitro*, empleando las técnicas reportadas por Alanís-García (1997), Braun y col. (1999) y Bover-Cid y col. (1999), respectivamente.

Las bacterias liofilizadas fueron reactivadas en caldo TSB (Difco, Detroit, EUA), para *Pseudomonas fluorescens* y *Brochothrix thermosphacta* y en caldo APT (Becton Dickinson, Cockersville, EUA) para el caso de *Lactobacillus minor*, incubándose durante 16-18 horas a 30 °C. El cultivo fresco fue centrifugado a 4000 g durante 10 minutos a 4 °C y el precipitado resuspendido en agua destilada estéril hasta obtener una concentración bacteriana de 10^4 - 10^5 UFC/mL. Dos mililitros de las suspensiones celulares fueron inoculados, de forma separada, en 50 g de carne (concentración final aproximada de 10^3 UFC/g de carne).

5.2.2 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias lácticas utilizadas como cultivos bioprotectores fueron: *Lactobacillus carnis* MXVK76, aislada por el Dr. Víctor Kuri y cedida gentilmente por la Queen's University, Belfast (Reino Unido); *Lactobacillus pentosus* (Christian Hansen, LP1-31035) y *Staphylococcus carnosus* (Christian Hansen, MC1-02055), cepas cedidas gentilmente por el Dr. Lone Andersen, Chr. Hansen (Dinamarca). Todas las bacterias bioprotectoras fueron aisladas a partir de carne y seleccionadas en base a una limitada actividad proteolítica,

lipolítica y aminodescarboxilasa, determinadas previamente empleando las técnicas reportadas por Braun y col. (1999) y Bover-Cid y col. (1999), respectivamente.

Las cepas liofilizadas fueron reactivadas en caldo APT (Becton Dickinson, Cockersville, EUA), incubándose durante 16-18 horas a 30 °C. La suspensión celular fue centrifugada a 4000 g durante 10 minutos a 4 °C y el precipitado resuspendido en agua destilada estéril hasta lograr una concentración aproximada de 10^6 - 10^7 UFC/mL. Tres mililitros de la suspensión bacteriana fueron inoculados en 50 g de carne, para lograr una densidad celular aproximada de 10^5 UFC/g de carne. La carne control fue inoculada con 3 mL de agua destilada estéril.

5.2.3 Ácido láctico

El tratamiento con ácido láctico se realizó adicionando a 50 gramos de carne cruda 5 mL de una solución del ácido (ácido láctico DL) (Baker, Xalostoc, México) al 2%, lográndose una concentración final de 200 mg/100 g de carne. La concentración final alcanzada está en función del grado de aceptación del consumidor (Nassos y col., 1983).

5.3 Almacenamiento de las muestras

La carne inoculada con las respectivas bacterias alterantes y con los diferentes tratamientos ácido lácticos (bacterias acidolácticas y ácido láctico) fue colocada en bolsas Cryovac® (Cryovac Division, W.R. Grace, Duncan, EUA) y envasada al vacío en un equipo Multivac D-8941 (Koch, Kansas, EUA) a -700 mBar. Las muestras tratadas se almacenaron a dos temperaturas: 4 °C (temperatura de refrigeración) y 20 °C (simulando la temperatura ambiente media del centro de México), durante 12 y 6 días respectivamente.

Para la realización de los análisis, se tomaron muestras los días 0, 4, 8 y 12 (para la carne almacenada bajo refrigeración) y los días 0, 2, 4 y 6 (para la carne almacenada a 20 °C).

5.4 Análisis microbiológicos

Se homogeneizaron 10 g de carne y 90 mL de agua destilada estéril en una licuadora doméstica (Oster, Bartlesville, EUA) a máxima potencia durante 30 segundos. A partir de esta dilución (10^{-1}) se realizaron diluciones seriadas empleando agua destilada estéril como diluyente.

Para realizar los conteos microbianos se inocularon 0.1 mL de las diluciones pertinentes en la superficie de los medios de cultivos empleados para cada tipo de microorganismo, esparciendo el inóculo con la ayuda de espátulas de Drygalski estériles. Agar para recuento en placa (Bioxon, Cuautitlán Izcalli, México) y agar Violeta Rojo Bilis Glucosa (Bioxon, Cuautitlán Izcalli, México) fueron seleccionados para realizar los recuentos de bacterias mesófilas totales y enterobacterias, respectivamente; el agar STAA (Gardner, 1966) se utilizó para el recuento de *B. thermosphacta*; para las bacterias lácticas se empleó el agar MRS (Merck, Darmstadt, Alemania) y para *Pseudomonas* spp. el agar F (Bioxon, Cuautitlán Izcalli, México) suplementado con 100,000 U.I. de penicilina G sódica por litro de medio. Los medios inoculados se incubaron a una temperatura de 30 °C durante 48 horas, excepto en el caso del recuento de enterobacterias que sólo demandó 24 horas de incubación. Las colonias presentes en agar F fueron expuestas a luz ultravioleta con el objetivo de revelar la producción de fluoresceína y eliminar de la cuenta las pseudomonas no fluorescentes y otros grupos microbianos (*Enterobacteriaceae*, *Alteromonas* spp., principalmente). Las bacterias lácticas heterofermentativas fueron cuantificadas inoculando las colonias presentes en el agar MRS en caldo APT sin citrato e incorporando campanas de Durham, incubándose posteriormente a 30 °C durante 24 horas. La presencia de gas fue considerada como una prueba positiva de la presencia de dicho tipo de bacterias lácticas.

5.5 Determinación de pH

El pH de cada muestra se determinó por triplicado, empleando para tal fin un potenciómetro Beckman (Beckman, Fullerton, EUA), previa homogeneización de 10 g de

carne con 90 mL de agua destilada estéril en una licuadora convencional (Oster, Bartlesville, EUA), a máxima velocidad durante 30 segundos.

5.6 Actividad lipolítica

El perfil de ácidos grasos de cadena larga se realizó de acuerdo con el método AOAC (1990). Inicialmente se picaron finamente 0.5 gramos de muestras de carne y se introdujeron en un sistema de reflujo en el interior de un matraz, con perlas de ebullición. A través del tubo refrigerante se adicionaron 6 mL de una solución 0.5 N de NaOH en metanol, para asegurar la saponificación de los ácidos grasos. Se sometió la mezcla durante 10 minutos a ebullición, agregándole posteriormente 7 mL de trifluoruro de boro en metanol al 14% (Aldrich, Milwaukee, EUA), dejándolo nuevamente en ebullición durante 5 minutos. Posteriormente, se adicionaron 1.5 mL de hexano (Baker, Xalostoc, México) sometiendo la mezcla durante un minuto a ebullición. Transcurrido ese tiempo se retiró el matraz y se dejó enfriar en un baño de hielo, para posteriormente agregarle una solución saturada de NaCl y llevar la fase orgánica hasta el cuello del matraz. Con pipeta Pasteur se retiró la fase orgánica, almacenándola bajo refrigeración en un tubo sellado durante un período no mayor a 6 horas.

Se inyectaron 0.4 μ l de cada muestra en un cromatógrafo de gases Varian CP-3800 (Varian, Walnut Creek, EUA), dotado de un detector de ionización de flama. La separación de los ácidos grasos de cadena larga se realizó en una columna DB-1 (J & W Scientific, Folsom, EUA) de 30 metros de longitud, 0.315 mm de diámetro interno y 0.25 μ m de espesor de película y compuesta en un 100% por dimetilpolixilosano. El análisis fue realizado isotérmicamente a una temperatura de horno de 250 °C y 300 °C para el inyector y detector. El gas acarreador empleado fue nitrógeno, empleándose un flujo de 1.5 mL/minuto y una presión de columna constante de 11.9 psi. Las áreas bajo los picos fueron procesadas por el software Star Chromatography Workstation, versión 4.5 (Varian Chromatography Systems, Walnut Creek, EUA). Los parámetros cromatográficos utilizados fueron los que presentaban mejor resolución de los picos y mayor reproducibilidad en las determinaciones. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron identificados mediante una mezcla de estándares de referencia de metil ésteres Sigma

(Sigma, San Luis, EUA) de ácido mirístico, palmítico, palmitoléico, esteárico, oléico, linoléico y linolénico. Cada muestra fue analizada por triplicado.

5.7 Actividad aminodescarboxilasa

La determinación de aminas biogénicas presentes en la carne se realizó de acuerdo al método reportado por Hwang y col. (1997). Esta técnica es sensible, con buena reproducibilidad, demanda un tiempo de corrida relativamente corto y los picos obtenidos evidencian buena resolución y simetría. Para realizarla se homogeneizaron en una licuadora doméstica (Oster, Bartesville, EUA) 5 g de carne con 20 mL de ácido tricloroacético (Baker, Xalostoc, México) al 6%, durante 1 minuto. El homogeneizado se centrifugó a 8000 g durante 10 minutos a 4 °C y el sobrenadante se filtró a través de un papel de filtro Whatman N° 2. El filtrado se transfirió a un matraz y se aforó a 25 mL con ácido tricloroacético al 6%.

Dos mililitros del filtrado se homogeneizaron con 10 µl de cloruro de benzoilo y 1 mL de hidróxido de sodio 2 M, incubándose durante 40 minutos a 30 °C. La derivatización se detuvo con 2 mL de una solución de NaCl 5 M y las amidas resultantes fueron extraídas con 3 mL de éter etílico. La fase orgánica fue evaporada hasta sequedad en un rotavapor Büchi 011 (Büchi, Flawil, Suiza) y el residuo fue disuelto en 500 µl de metanol grado HPLC.

Alícuotas de 50 µl (previamente clarificadas en filtros de 0.45 µm) fueron inyectadas en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Waters (Waters, Milford, EUA), equipado con una bomba 626 y un detector de arreglo de diodos UV-VIS 994 integrados a un software Millennium version 2.1 (Waters, Milford, EUA). Para la separación se empleó una columna de fase inversa Symmetry[®] C18 (Waters, Milford, EUA), de 150 mm de longitud, 3.9 mm de diámetro y un tamaño de partícula de 5 µm. El flujo de la fase móvil empleado fue de 0.5 mL/minuto, siguiendo el programa de elución presentado en la tabla 5. La derivatización con cloruro de benzoilo es más corta y requiere un menor tiempo de elución en comparación con otras derivatizaciones. El tiempo y temperatura de derivatización se escogió basándose en la buena respuesta y

reproducibilidad de los picos obtenidos para cada amina biogénica y en la menor interferencia posible con los picos de cloruro de benzoilo remanente. El cromatograma se obtuvo a una longitud de onda de 254 nm.

Tabla 5: Programa de elución para el análisis de aminas biogénicas

Tiempo (minutos)	Metanol 100% (%)	Metanol 55% (%)
0	0	100
8	0	100
10	56	44
20	56	44
21	100	0
25	100	0
27	0	100
28	0	100

La curva estándar para cada amina biogénica se obtuvo utilizando estándares de cadaverina dihidroclorada, putrescina dihidroclorada, tiramina e histamina dihidroclorada (Sigma, San Luis, EUA). Cada muestra fue analizada por triplicado.

5.8 Extracción de proteínas miofibrilares

La extracción de proteínas miofibrilares se llevó a cabo según la técnica reportada por Ngapo y col. (1992), con algunas modificaciones. Esta técnica es de fácil ejecución, rápida y presenta un buen rendimiento de extracción de las proteínas miofibrilares. Para realizarla se homogeneizaron 25 g de carne con hielo y agua fría en las mismas proporciones (1:1:1 p/p) en una licuadora doméstica (Oster, Bartsville, EUA) hasta integrar totalmente la carne con el agua. Este extracto se mantuvo en agitación durante 10 minutos en baño de hielo y posteriormente se filtró a través de un colador metálico de cocina para retirar el tejido conjuntivo. Se añadieron 2-3 volúmenes de agua fría y se agitaron 15 minutos más. El homogeneizado se centrifugó a 2000 g durante 10 minutos a 4 °C y el precipitado fue resuspendido en una solución de NaCl 0.6 M y 50 mM de tampón fosfato a pH 7.

5.9 Actividad proteolítica

La degradación de las proteínas miofibrilares fue evaluada como un indicador de la actividad proteolítica sufrida por la carne.

Las muestras de extractos de proteínas miofibrilares fueron evaluadas electroforéticamente de acuerdo al método reportado por Laemmli (1970). Los extractos proteicos (5 mg/mL) se mezclaron, en una proporción 1:4, con una solución de buffer de muestra que contenía 2% de SDS y 5% de 2 β -mercaptoetanol. Inmediatamente antes del análisis electroforético las muestras se sometieron a un tratamiento de ebullición durante 4 minutos, analizándose los extractos mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Se utilizó un gel de separación con el 12% (T) de acrilamida y un gel de concentración con el 4% (T) de acrilamida. El equipo utilizado fue un Mini-Protean II slab Cell de Bio-Rad (Richmond, California, EUA). Se emplearon 16 μ l de muestra y una mezcla de marcadores para geles de electroforesis con un intervalo de pesos moleculares entre 25 y 250 kDa. La electroforesis se realizó a 200 voltios durante 45 minutos, para luego fijar y teñir los geles en una solución de azul de Coomassie al 1% en metanol:ácido acético:agua (40:10:50 v/v) durante 30 minutos. El revelado de los geles se realizó utilizando la misma solución de metanol:ácido acético:agua durante 4 horas, con cuatro recambios. Los geles fueron escaneados utilizando un equipo Gel-Doc 2000 (Bio-Rad) acoplado a un software Quantity One™ versión 4 (Bio-Rad), que permite analizar la densidad óptica (D.O.) relativa de cada banda respecto del total de bandas encontradas por muestra.

Debido a que la densidad de la cadena pesada de la miosina se puede correlacionar con la cantidad de miosina (Claeys y col., 1995), se calculó un índice de actividad proteolítica, empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Cadena pesada de la miosina} = \left\{ \left[\frac{\text{D.O. cadena pesada de la miosina}}{\sum \text{D.O de todas las bandas}} \right] \times 100 \right\} \text{ Ecuación 3}$$

5.10 Solubilidad

La solubilidad se determinó según el método propuesto por Li-Chan y col. (1984), en el que las muestras de proteínas miofibrilares (5 mg/mL, a pH 7) son centrifugadas a 25,000 g durante 30 minutos a 4 °C. El contenido de proteína del sobrenadante se determina, reportándose la solubilidad como la relación entre el contenido de proteína del sobrenadante y el contenido de proteína de la muestra sin centrifugar multiplicada por 100.

El contenido de proteína se determinó por el método de Biuret, según lo reportado por Alanís-García (1997). A 1 mL de muestra se le adicionaron 3 mL del reactivo de Biuret, se agitó suavemente durante unos segundos para homogeneizar la mezcla y se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-650 (Beckman, Fullerton, EUA). Para cuantificar la reacción se construyó una curva estándar con albúmina sérica bovina (Sigma, San Luis, EUA), realizando las diluciones pertinentes.

5.11 Determinación de grupos sulfhidrilos

Se siguió la metodología reportada por Totosaus-Sánchez (1996). Se mezcló 1 mL de solución proteica (5 mg/mL, a pH 7) y 9 mL de una solución de urea 8 M en una solución amortiguadora Tris-Glicina-EDTA (10.4 g/L Tris; 6.9 g/L Glicina; 1.2 g/L EDTA; pH 8), dejando reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, se tomaron 3 mL de dicha mezcla y se añadieron 50 µl de una solución del reactivo 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzónico (Sigma, San Luis, EUA) (4 mg/mL, en la misma solución amortiguadora) dejándose reposar durante otros 30 minutos. Transcurrido ese período, se midió la absorbancia a 412 nm. La concentración de grupos SH se calcula utilizando la ecuación 4.

$$\mu\text{Moles-SH/g proteína} = \frac{75.53 \times \text{Abs}_{412\text{nm}} \times 10}{\text{concentración proteica}} \quad \text{Ecuación 4}$$

5.12 Propiedades de gelificación

5.12.1 Pruebas de penetración de geles

La prueba de penetración de geles obtenidos de proteínas miofibrilares se realizó de acuerdo a lo sugerido por Hickson y col. (1982). Esta prueba consiste en determinar la fuerza requerida para introducir un vástago dentro de una muestra de gel, metodología que ha sido utilizada para observar los cambios que ocurren en la textura de los alimentos durante el almacenamiento y que ha mostrado una buena correlación con los análisis de tipo sensorial (Barroso y col., 1998). Para realizarla, las soluciones proteicas (con una concentración de 20-25 mg/mL, en amortiguador de fosfatos 50 mM y NaCl 0.6 M a pH 6) se colocaron en tubos de vidrio de 25 mm de diámetro interno y 80 mm de alto. Los tubos se sumergieron en un baño de agua, sometándose a calentamiento gradual de 1°C/minuto desde la temperatura ambiental hasta 70 °C. Una vez alcanzada la temperatura final, los tubos se colocaron en un baño de hielo durante 30 minutos para luego ser almacenados bajo refrigeración durante 12 horas.

La prueba de penetración de geles se realizó en un texturómetro TAX-T2 (Texture Technologies Corp., Scardale, EUA) equipado con el software Textur Expert™ (versión 1.20, Stable Micro Systems, Surrey, Inglaterra) y con una celda de carga de 5 Kg. Los geles formados en los tubos se colocaron en una base y se penetraron utilizando un vástago de acrílico de 8 mm de diámetro. La elección del tipo de tubo para contener los geles y el diámetro del vástago estuvo de acuerdo al principio de “geometría semiinfinita” (Klettner, 1995), por el cual el espécimen de prueba debe ser mucho más ancho que el diámetro del vástago (por lo menos 3 veces), para evitar los efectos producidos en los lados y esquinas de la muestra. La velocidad de descenso del vástago fue de 1 mm/segundo y la penetración correspondió al 60% del espesor del gel. El valor obtenido fue el trabajo total o área bajo la curva, expresado en Newtons/segundo.

5.12.2 Estudios reológicos dinámicos (G' , G'' , $\tan \delta$)

Los cambios reológicos ocurridos en la suspensión de proteínas miofibrilares durante la gelificación térmica fueron analizados empleando un reómetro Bohlin CVO 50 (Bohlin Instruments, Nueva Jersey, EUA), operando en un modo de pequeña amplitud oscilatoria de acuerdo con lo reportado por Visessanguan y col. (2000). Mediante esta prueba el material es sujeto a una deformación oscilatoria pequeña dentro de la región viscoelástica lineal, detectándose la magnitud de la onda de fuerza resultante. Debido al desarrollo gradual de la viscoelasticidad durante la gelificación, los geles y el proceso de gelificación son caracterizados en forma más adecuada por estas pruebas de pequeña amplitud (Van Vliet, 1999). El reómetro fue equipado con una geometría del tipo platos paralelos de 40 mm de diámetro, utilizando un espacio entre platos de 1 mm. Las suspensiones de proteínas miofibrilares (con una concentración de 20-25 mg/mL, en un amortiguador de fosfatos 50 mM, NaCl 0.6 M a pH 6) fueron colocadas entre el plato superior e inferior. Para evitar la deshidratación de las muestras se colocó aceite mineral ligero Marcol GX (Hycel, Zapopan, México). Las muestras fueron sometidas a un esfuerzo oscilatorio de frecuencia 0.1 Hz, para minimizar el esfuerzo en las muestras durante la formación del gel y con un esfuerzo máximo de 0.1 Pas. Estos parámetros fueron previamente seleccionados por encontrarse dentro de la región viscoelástica lineal. Las muestras fueron sometidas a un calentamiento gradual de 1°C/minuto desde 25 a 80 °C, utilizando una unidad de control de temperatura Neslab RTE-111 (Neslab Instruments, Newington, EUA). Los datos fueron colectados cada 60 segundos y el desarrollo del gel fue estudiado en tiempo real, mediante la medición de los cambios en el módulo de almacenamiento (G'), módulo de pérdida (G'') y $\tan \delta$ en función de la temperatura.

5.12.3 Microscopía Electrónica de Barrido

Para observar el efecto de los diferentes tratamientos sobre la microestructura de los geles de proteínas miofibrilares se utilizó microscopía electrónica de barrido (MEB). Los geles se obtuvieron a partir de una solución proteica con concentración de 20-25 mg/mL (en amortiguador de fosfatos 50 mM, NaCl 0.6 M a pH 6), colocada en una funda de

poliamida para salchicha de 2 cm de diámetro. Las fundas se sumergieron en un baño de agua, siendo sometidas a un calentamiento gradual de 1 °C/minuto desde la temperatura ambiental hasta 70 °C. Una vez alcanzada la temperatura final, las muestras se colocaron en un baño de hielo durante 30 minutos, para luego ser almacenadas bajo refrigeración durante 12 horas. Transcurrido dicho tiempo, las muestras se cortaron en pequeños trozos y se fijaron primariamente en fijador de Karnovsky (amortiguador de cacodilato sodico, glutaraldehído y formaldehído al 3%) (Dawes, 1971), a 4 °C durante 24 horas. Posteriormente, se realizaron lavados con amortiguador de fosfatos (pH 7.4) hasta no percibir olor a glutaraldehído. La fijación secundaria se realizó con una solución de tetróxido de osmio durante 2 horas para luego lavar y desecar las muestras con sucesivas soluciones de alcohol en concentraciones crecientes, desde 30 a 100%. A continuación, las muestras se secaron hasta el punto crítico empleando un equipo Samdri-780 B (Tousimis, Research Co., EUA). Las muestras desecadas se colocaron en los portamuestras adhiriéndolas con cinta de carbón y carbón coloidal y fueron recubiertas con carbón y oro utilizando un cobertor por ionización (BAL-TEC SCD 050, Liechteinstein). Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-5900 LV (Jeol, Tokio, Japón), operando a una aceleración de 10 kV y una distancia lente-muestra de 12 mm, obteniéndose una ampliación de la imagen de 15,000 x.

5.13 Propiedades de emulsificación

5.13.1 Índice de Actividad de Emulsión

Para la determinación del Índice de Actividad de Emulsión (IAE) se siguió la metodología reportada por Pearce y Kinsella (1978), con las modificaciones introducidas por Cameron y col. (1991). El IAE es el área superficial por unidad de masa emulsificada y está relacionado con la cantidad de área creada durante la emulsificación. Para la realización de esta técnica se tomaron 2 mL de aceite de girasol y 6 mL de suspensión proteica (5 mg/mL) en un tubo de vidrio (2.7 cm de diámetro por 9.2 cm de alto) y se homogeneizaron durante 30 segundos a temperatura ambiente (18-20 °C), empleando un biohomogeneizador M 133 (Biospec Products, Bartlesville, EUA) a una velocidad

aproximada de 12,000 rpm. Se dejó reposar la muestra durante 1 minuto, se tomó una alícuota de 0.5 mL y se diluyó en 4.5 mL de una solución de SDS al 0.3% (p/v). Tras dispersar manualmente la muestra se transfirió a una celda de vidrio y se determinó su absorbancia a una longitud de onda de 500 nm. El IAE fue calculado aplicando la ecuación 5. La concentración de SDS utilizada en esta prueba persigue el propósito de estabilizar las partículas en la emulsión y garantizar la reproducibilidad del método.

$$\bar{IAE} = [2(2.303 \times Ab_{500nm} \times \text{dilución})]/(L C (1-\phi)) \quad \text{Ecuación 5}$$

donde:

L = longitud de la celda (0.01 m)

C = concentración de proteína

ϕ = fracción de aceite en el sistema, siendo calculada mediante la ecuación 6.

$$\phi = \frac{(P_3 - P_1) - E (P_2 - P_3)}{(P_3 - P_1) + (P_2 - P_3) \times ((1 + E) D_0/D_s - E)} \quad \text{Ecuación 6}$$

donde:

P_1 = peso del vaso de precipitado (g)

P_2 = peso del vaso más la emulsión (g)

P_3 = peso del vaso más la sustancia seca (g)

D_0 = densidad del aceite con respecto al agua

D_s = densidad relativa de la fase proteica con respecto al agua

E = concentración de solutos (g/g).

La emulsión seca se obtiene desecando hasta peso constante 1 mL de la emulsión a 120 °C durante 1 hora (Ancín y col., 1989).

5.13.2 Índice de Estabilidad de Emulsión

Para la determinación del Índice de Estabilidad de Emulsión (IEE) se siguió la metodología reportada por Totosa-Sánchez (1996). Se tomaron alícuotas de 0.5 mL de una emulsión similar a la realizada para la determinación del IAE y se resuspendieron en 4.5 mL de una solución de SDS al 0.3%. Se dejó reposar la mezcla durante 90 minutos y se midió la absorbancia a 500 nm. El IEE se reportó como el porcentaje de absorbancia remanente a los 90 minutos con respecto a la absorbancia de la emulsión en el tiempo 0.

5.13.3 Capacidad de Emulsión

La capacidad de emulsión (CE) se determinó mediante conductividad eléctrica, método basado en la resistencia o conductividad eléctrica específica de una emulsión (Hung y Zayas, 1991). La CE refleja la cantidad máxima de aceite que es emulsificado, bajo condiciones específicas, por una cantidad estándar de proteína antes de la inversión o colapso de la emulsión (Pearce y Kinsella, 1978). Se utilizó para determinarla la metodología reportada por Totosa-Sánchez (1996), empleando un tubo de 3.2 cm de diámetro por 10 cm de alto en el cual se colocaron dos alambres de cobre n° 14 como electrodos, a medio centímetro del fondo. Se adicionaron al tubo 10 mL de aceite de girasol y 5 mL de solución proteica (5 mg/mL) y se homogeneizó con un biohomogeneizador M 133 (Biospec Products, Bartlesville, EUA) a 12,000 rpm durante 5 segundos. Posteriormente se adicionó aceite con una bureta, a una velocidad de 1 mL cada 6-7 segundos, registrando la conductancia eléctrica con un multímetro SANWA (Sanwa Electronic, Japón) hasta que ésta se interrumpió abruptamente. Se determinaron los mililitros adicionados y se reportaron por 100 mg de proteína.

5.14 Determinación de color

La determinación del color se realizó utilizando un colorímetro Hunter Lab modelo D25-PC2 (Chroma Meter CR-200, Tokio, Japón). Este sistema consta básicamente de una fuente de luz que, al incidir sobre la muestra, provoca una reflexión difusa que pasa a través de una serie de filtros (acoplado, cada uno, a un fotorreceptor). Los filtros intentan

reproducir las curvas de sensibilidad de un observador estándar establecidas por la CIE (Comité Internacional de la Iluminación), creándose una respuesta en el fotodetector semejante a la que se daría en el ojo humano cuando observa la misma muestra iluminada por la fuente estándar (Pérez-Álvarez y col., 1998). Se siguieron las recomendaciones aportadas por Cassens y col. (1995), empleando una fuente de luz D65, un sistema iluminación / observador 45/0 y un observador estándar 10°. Las muestras se midieron por cuadruplicado, rotando el portamuestras 90° entre cada lectura. Los parámetros estándar determinados fueron L^* , a^* y b^* . Los valores de a^* y b^* se transformaron a coordenadas polares, para obtener de esta forma los valores de cromaticidad (medida de la intensidad del color) y tonalidad (rotación en torno al eje a^* b^*) mediante las ecuaciones 7 y 8.

$$\text{Tonalidad (h)} = \text{arcTan}(b^*/a^*) \quad \text{Ecuación 7}$$

$$\text{Cromaticidad (C)} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad \text{Ecuación 8}$$

Adicionalmente, se obtuvo el espectro de reflectancia para cada muestra, calculándose el índice de decoloración (ID) mediante la ecuación 9 (Brewer y col., 1991).

$$\text{ID} = \%R_{630\text{nm}} / \%R_{580\text{nm}} \quad \text{Ecuación 9}$$

5.15 Análisis Estadístico

Para analizar el efecto de los tratamientos lácticos sobre las variables de respuesta, los tratamientos se asignaron aleatoriamente en un diseño factorial 5 x 4 (tratamientos: control, *L. carnis*, *L. pentosus*, *S. carnosus* y ácido láctico; tiempo de almacenamiento: 0, 4, 8 y 12 días y 0, 2, 4 y 6 días para el almacenamiento a 4 y 20 °C, respectivamente). Cada temperatura de almacenamiento estudiada (4 y 20 °C) se analizó independientemente. Se utilizó la técnica de Duncan de comparaciones múltiples de medias. El estudio fue realizado empleando 3 repeticiones para cada microorganismo alterante utilizado. Los análisis estadísticos fueron realizados empleando el paquete SPSS versión 8.0.

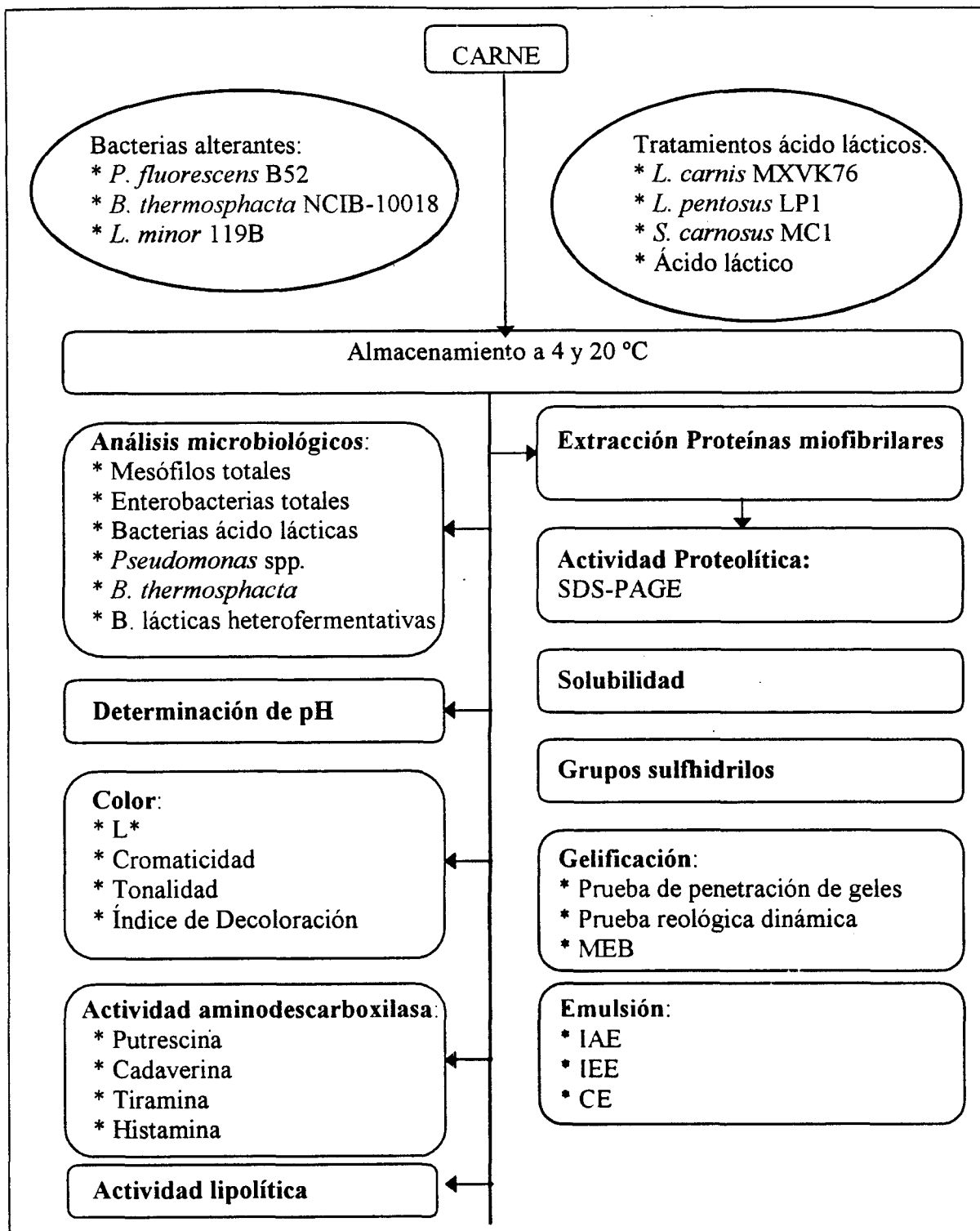


Figura 8: Diagrama general del protocolo experimental.

**RESULTADOS
Y
DISCUSIÓN**

6. Resultados y Discusión

6.1 Análisis microbiológicos

La selección de la flora alterante debe ser considerada en el contexto de cuatro sistemas interactuando: 1) los nutrientes presentes en el alimento, 2) los atributos fisiológicos del microorganismo, 3) factores extrínsecos (temperatura, composición de gases del ambiente, humedad relativa, etc.) y 4) factores de procesamiento. Obviamente la carne bovina presenta todos los requerimientos nutricionales para mantener el crecimiento de diversos microorganismos, aunque dichas facilidades son menores en la carne postrigor por la disminución en la concentración de glucosa y la reducción del pH (Nychas y col., 1988).

6.1.1 Carne almacenada a 4 °C

El recuento de bacterias mesófilas totales se presenta en la figura 9a. La carne tratada con ácido láctico muestra los menores recuentos bacterianos a lo largo del período de almacenamiento bajo refrigeración ($p > 0.001$) y el realizado con *L. pentosus* fue el tratamiento que presentó los mayores recuentos ($p > 0.001$) (Anexo 1, tabla 6). Las reducciones en la población de mesófilos totales en la carne tratada con ácido láctico están en concordancia con lo reportado por Anderson y Marshall (1990), Brewer y col. (1991), Lamkey y col. (1991) y Borpuzari y Borpuzari (1995) quienes observaron reducciones superiores a 1 ciclo logarítmico en carne tratada superficialmente con una solución de ácido láctico al 2%.

El recuento de bacterias lácticas fue significativamente superior en la carne inoculada con *L. carnis* y *L. pentosus* ($p > 0.001$) (figura 9b), lo que evidencia una gran adaptabilidad al sustrato, a la temperatura de incubación y al ambiente cárnico almacenado bajo vacío por parte de estas cepas de bacterias bioprotectoras. *S. carnosus* mostró un crecimiento menor al evidenciado por los otros microorganismos bioprotectores pero sí logró cuentas superiores a las de la carne control ($p > 0.05$). La concentración de bacterias lácticas en carne tratada con ácido láctico fue aproximadamente un ciclo logarítmico inferior con respecto al control ($p > 0.01$), especialmente en los primeros cuatro días de almacenamiento bajo refrigeración. Si bien las bacterias lácticas producen dicho

compuesto, como consecuencia de su metabolismo fermentativo (Holt y col., 1994), es probable que la concentración del ácido utilizada durante el diseño experimental fuera lo suficientemente elevado como para inducir un efecto bacteriostático sobre este grupo microbiano (Anexo 1, tabla 7). Resultados similares han sido reportados por Zamora y Zaritzky (1987a y 1987b) y Borpuzari y Borpuzari (1995), encontrándose incrementos en la fase de latencia y disminuciones en la tasa de crecimiento de las bacterias lácticas en carne tratada con ácidos orgánicos como sanitizante. No obstante, estos resultados se contradicen con los reportados por Mendonca y col. (1989), quienes no observaron reducciones significativas en el número de bacterias lácticas en carne tratada con ácido láctico. Las bacterias lácticas presentes en la carne control, pertenecientes a la flora nativa, permanecieron aproximadamente un orden de magnitud por debajo de la concentración evidenciada en la carne inoculada con *L. carnis* y *L. pentosus*, excepto al final del período de almacenamiento.

El tratamiento con ácido láctico fue el más efectivo para reducir el número de enterobacterias ($p > 0.01$). Resultados similares fueron reportados por Mendonca y col. (1989), Anderson y Marshall (1990) y Borpuzari y Borpuzari (1995), quienes observaron reducciones en el número de enterobacterias de aproximadamente 2 ciclos logarítmicos por gramo de carne tratada con ácido láctico. Asimismo, los tratamientos con *L. carnis* y *L. pentosus* provocaron disminuciones significativas ($p > 0.01$) en los recuentos de enterobacterias, con respecto al control (figura 9c), de aproximadamente 1 ciclo logarítmico (Anexo 1, tabla 8). Las bacterias lácticas no mostraron fase de latencia durante su crecimiento en la carne almacenada bajo refrigeración, multiplicándose y disminuyendo el pH desde el inicio del experimento, compitiendo de tal forma con los microorganismos alterantes. Reducciones similares en el número de enterobacterias fueron reportadas por Minor-Pérez (1998) y Quintero-Salazar (2001) utilizando cultivos bioprotectores en carne de cerdo y pollo, respectivamente. Estas reducciones marcadas en el número de enterobacterias son promisorias desde el punto de vista de la salud pública y justificarían futuros ensayos sobre el potencial de los tratamientos ácido lácticos para el control de microorganismos patógenos (*Salmonella* spp., *E. coli*, entre otras) en carne envasada al vacío.

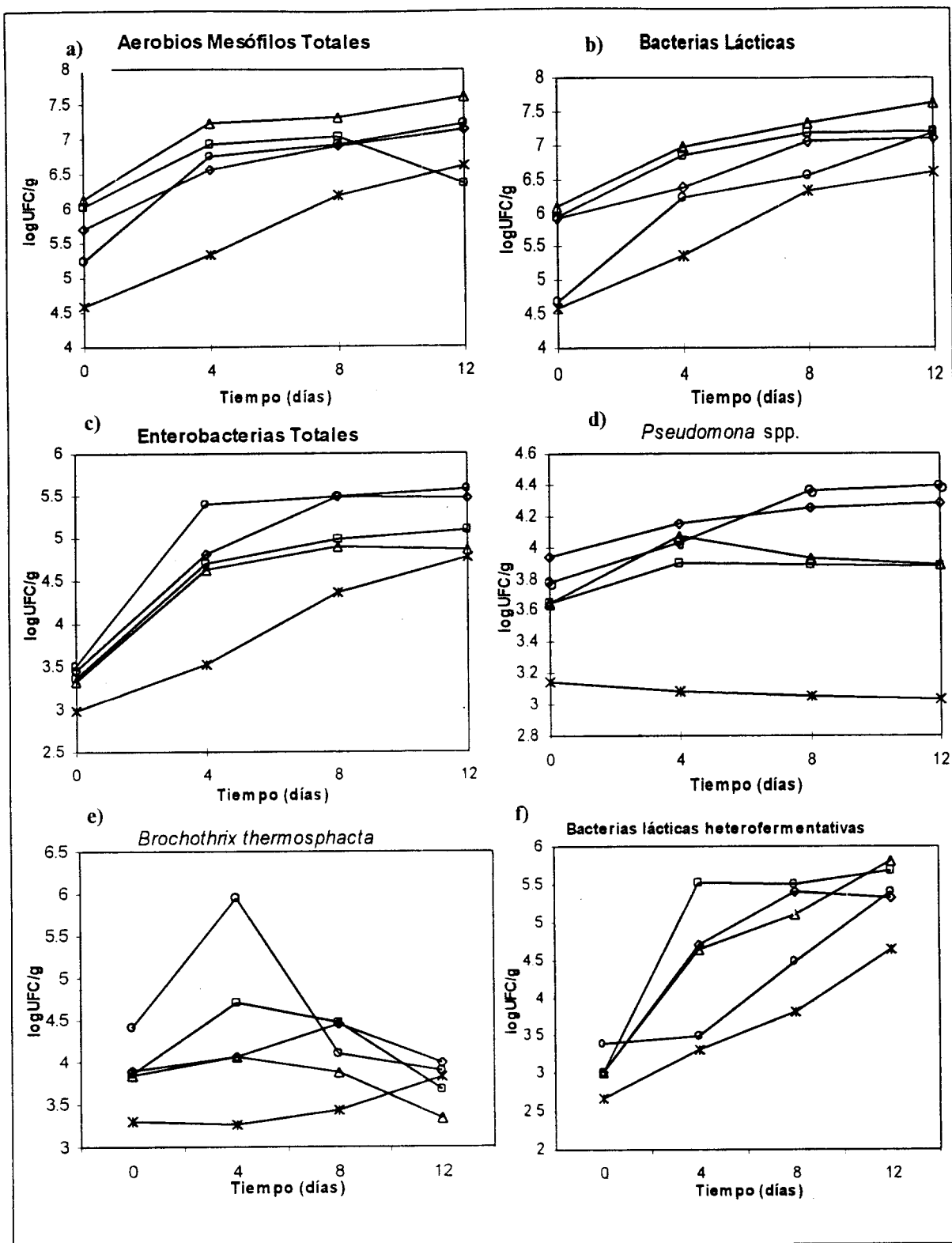


Figura 9: Análisis microbiológicos en carne almacenada a 4 °C

Referencias : □, *L. carnis*; Δ, *L. pentosus*; ◇, *S. carnosus*; *, ácido láctico; O, control.

El ácido láctico fue el tratamiento más efectivo para reducir la población de *Pseudomonas* spp. ($p > 0.05$) (figura 9d) (Anexo 1, tabla 9). Este ácido orgánico logró reducciones de 1 ciclo logarítmico en comparación con el tratamiento control, observándose un bajo recuento inicial de *Pseudomonas* spp., seguido de un prolongado período de bacteriostasis a lo largo del período de almacenamiento a 4 °C. Estos datos concuerdan con los resultados presentados por Greer y Dilts (1994) y Nissen y col. (2001). Es importante destacar que el resto de los tratamientos efectuados no presentan diferencias significativas, desde el punto de vista estadístico ($p > 0.576$), respecto del tratamiento control. Probablemente, la incubación de la carne bajo condiciones de anaerobiosis y refrigeración fue suficiente para controlar el crecimiento de *Pseudomonas* spp. Y, por ende, los tratamientos con bacterias lácticas no mostraron un efecto inhibitorio adicional.

Bajo refrigeración, la carne tratada con ácido láctico evidenció importantes reducciones en la cuenta de *B. thermosphacta* ($p > 0.05$). De la misma forma que se observó en la cuantificación de *Pseudomonas* spp., el crecimiento de *B. thermosphacta* muestra una reducción inicial de aproximadamente 1 ciclo logarítmico en la carne tratada con ácido láctico respecto al control. Este efecto bactericida está en concordancia con los resultados de Greer y Dilts (1994), quienes reportaron que este microorganismo alterante es más sensible al ácido láctico que las *Pseudomonas* spp. y su número disminuye más allá de niveles detectables después de 15 días de almacenamiento a 4 °C. Los cultivos bioprotectores mostraron reducciones hasta 10^4 - 10^5 UFC/g, pero fueron estadísticamente no significativos con respecto al control ($p > 0.087$) (figura 9e) (Anexo 1, tabla 10). A esta temperatura de almacenamiento, la población de *B. thermosphacta* muestra un incremento durante los primeros cuatro días en la carne control (alcanzando concentraciones de 10^6 UFC/g), para posteriormente disminuir hasta niveles similares a los iniciales. El bajo crecimiento evidenciado por *B. thermosphacta* está en concordancia con lo informado por Campbell y col. (1979) y Nychas y col. (1988), quienes sostienen que altas poblaciones de bacterias lácticas y enterobacterias inhiben el crecimiento de este microorganismo cuando la carne es envasada en anaerobiosis.

La adición de ácido láctico fue también el mejor tratamiento para controlar la población de bacterias lácticas heterofermentativas en la carne almacenada bajo refrigeración ($p > 0.001$), alcanzando niveles de 1 ciclo logarítmico inferiores (hacia el final del período de almacenamiento) en comparación con la carne control (figura 9f). Las bacterias lácticas utilizadas en los tratamientos no fueron capaces de lograr reducciones significativas en la población de estos microorganismos alterantes ($p > 0.140$) (Anexo 1, tabla 11).

6.1.2 Carne almacenada a 20 °C

Cuando la carne se almacenó bajo condiciones de abuso térmico, el tratamiento con ácido láctico mostró los menores recuentos de microorganismos aerobios totales ($p > 0.001$), bacterias lácticas ($p > 0.01$), enterobacterias ($p > 0.01$), *Pseudomonas* spp. ($p > 0.002$), *B. thermosphacta* ($p > 0.05$) y bacterias lácticas heterofermentativas ($p > 0.01$) (figura 10a, 10b, 10c, 10d, 10e y 10f, respectivamente) (Anexo 1, tablas 6, 7, 8, 9, 10 y 11). Esto es una evidencia de la importante actividad antibacteriana de este ácido orgánico y se muestra en concordancia con los resultados de Anderson y Marshall (1990), Brewer y col. (1991) y Borpuzari y Borpuzari (1995). El ácido láctico logró controlar el número de enterobacterias, *Pseudomonas* spp., *B. thermosphacta* y bacterias lácticas heterofermentativas, alcanzando reducciones en la población final de 2.5, 2, 1.5 y 0.5 ciclos logarítmicos respectivamente, con respecto al control.

Los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos totales ($p > 0.05$) y bacterias lácticas ($p > 0.05$) fueron estadísticamente superiores para la carne inoculada con *L. carnis* y *L. pentosus* en comparación con la carne control (figura 10a y 10b, respectivamente) (Anexo 1, tablas 6 y 7).

L. carnis y *L. pentosus* mostraron recuentos de enterobacterias significativamente menores ($p > 0.05$) en comparación con el control (figura 10c) (Anexo 1, tabla 8). Estos cultivos bioprotectores lograron reducciones en el recuento de enterobacterias de aproximadamente 0.5 ciclos logarítmicos con respecto al control, reducciones importantes

considerando que las enterobacterias constituyen uno de los grupos microbianos alterantes nativos más importantes y que encuentran a 20°C condiciones óptimas para su crecimiento (Schoebitz y col., 1990). Si bien la población inicial de este grupo microbiano alterante fue inferior a la reportada por Pérez-Chabela y col. (1999), constituye una cuenta inicial muy elevada en comparación con carne obtenida en frigoríficos de otros países (Lasta y Gimeno, 1993), lo que trae aparejado una menor efectividad antibacteriana por parte de los tratamientos ácido lácticos. Reducciones en la cuenta de enterobacterias en carne de cerdo almacenada a 20 °C, mediante la inoculación de bacterias lácticas, fueron reportadas por Minor-Pérez (1998).

Las cepas de microorganismos biopreservantes mostraron efecto sobre el crecimiento de *Pseudomonas* spp. ($p > 0.05$), alcanzando reducciones de aproximadamente 1-2 ciclos logarítmicos con respecto al control (figura 10d) (Anexo 1, tabla 9). Estos resultados están en concordancia con los de Guerrero-Legarreta y col. (1995), quienes observaron reducciones significativas en la población de *Pseudomonas* spp. en carne tratada con bacterias lácticas y almacenada a temperaturas de 15 y 27 °C, diferencias atribuidas a la competencia entre grupos microbianos. Estos resultados refuerzan el potencial de las cepas bioprotectoras para controlar el crecimiento de *Pseudomonas* spp. a temperaturas superiores a 15 °C, en coincidencia con lo descrito por Andersen (1995). En la figura 10 puede observarse un importante crecimiento de *Pseudomonas* spp. a pesar de que este microorganismo es aeróbico. Su multiplicación pudo estar ocasionada por el aire residual presente en el empaque al vacío (Nissen y col., 2001).

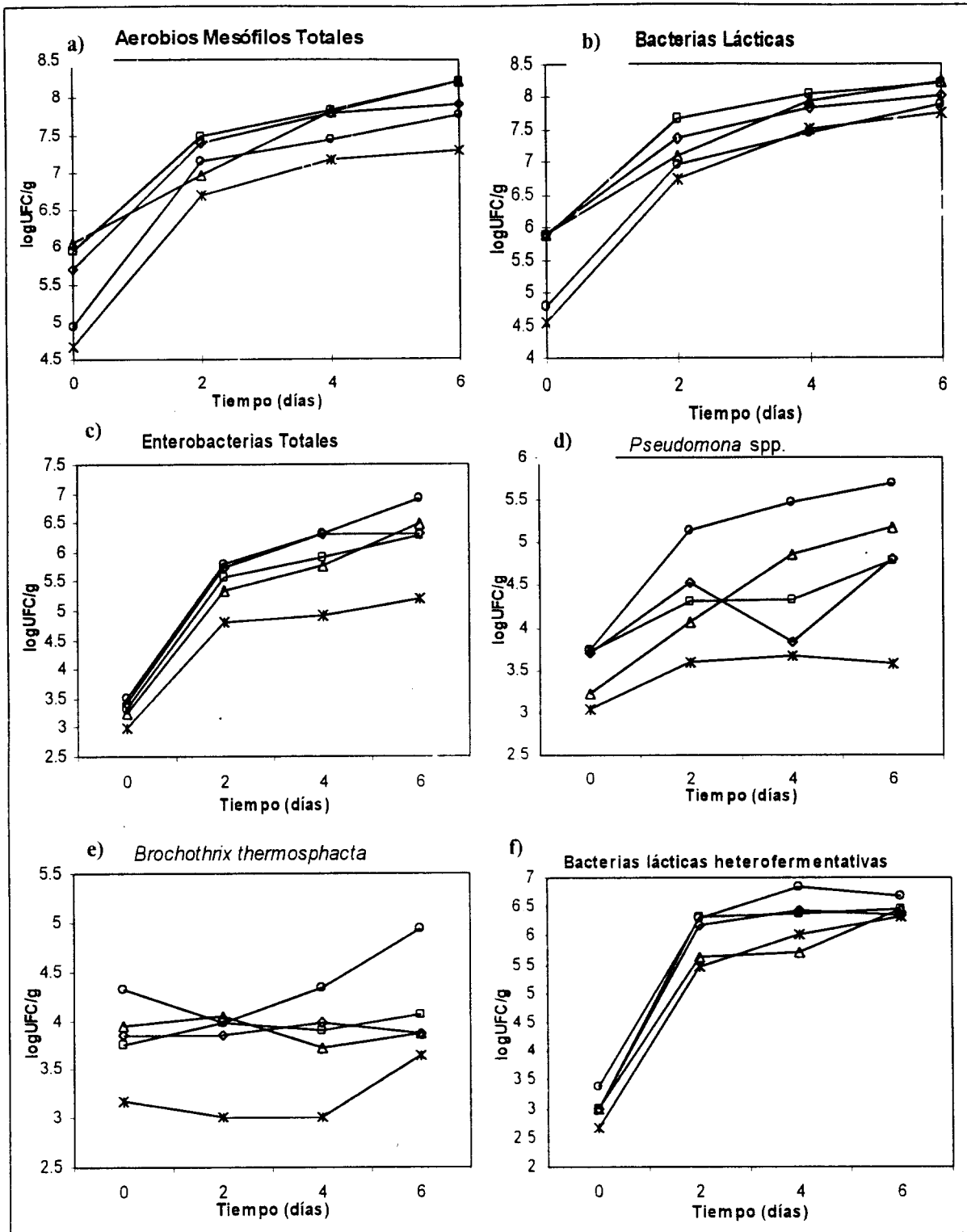


Figura 10: Análisis microbiológicos en carne almacenada a 20 °C

Referencias : □, *L. carnis*; Δ, *L. pentosus*; ◇, *S. carnosus*; *, ácido láctico; O, control.

La población de *B. thermosphacta* no mostró un crecimiento importante a lo largo del estudio, alcanzando concentraciones finales de 10^5 UFC/g en la carne control. Probablemente debido a este escaso desarrollo, los cultivos bioprotectores no evidenciaron reducciones significativas sobre el crecimiento del microorganismo alterante en comparación con el control ($p > 0.305$) (Anexo 1, tabla 10). No obstante, se puede observar un incremento importante en la población de *B. thermosphacta* en la carne control, hacia el final del estudio, sugiriéndose estudiar el efecto de los tratamientos lácticos sobre el crecimiento de microorganismos alterantes en tiempos superiores a los empleados en el presente experimento (figura 10e). Gill y Newton (1980) concluyen que una fase de latencia prolongada y la competencia por los nutrientes son probablemente los responsables de la ausencia de crecimiento de *B. thermosphacta* en la carne almacenada a 20 °C en anaerobiosis, a pesar de que en cultivos puros este microorganismo sea capaz de crecer al mismo ritmo que sus competidores.

La población de bacterias lácticas heterofermentativas en la carne control fue superior con respecto a los tratamientos ácido láctico ($p > 0.01$), mientras que los tratamientos con *L. pentosus* y ácido láctico mostraron los menores niveles ($p > 0.01$), reduciendo aproximadamente 1 ciclo logarítmico durante todo el período de almacenamiento (figura 10f) (Anexo 1, tabla 11). Según lo reportado por Egan y Shay (1982), las bacterias lácticas heterofermentativas crecen rápidamente en carne envasada al vacío y almacenada durante 7 días a 5 °C. Estas bacterias provocan la aparición de aromas extraños y la aceptabilidad de la carne disminuye más rápidamente que la de la carne sin inocular con estos microorganismos, lo cual justifica las ventajas de su control.

6.2 Determinación de pH

6.2.1 Carne almacenada a 4 °C

Almacenando la carne bajo refrigeración, el tratamiento con ácido láctico produjo los menores valores de pH ($p > 0.001$) y esta reducción fue inmediata (figura 11), como fue reportado previamente por Anderson y Marshall (1990), Greer y Dilts (1994) y Borpuzari y Borpuzari (1995), observándose en sus casos reducciones superiores a 0.9 puntos en carne

tratada con ácido láctico al 2%. Hasta el octavo día del experimento el pH continúa disminuyendo, hasta valores de 4.8. *L. carnis* y *L. pentosus* redujeron el pH de la muestra con mayor eficiencia que *S. carnosus* ($p > 0.05$). El comportamiento observado está en concordancia con sus curvas de crecimiento (figura 9b), lo cual indica que *S. carnosus* es menos efectivo para mantener un bajo pH en el transcurso del almacenamiento. La carne control y la inoculada con *S. carnosus* presentaron los mayores valores de pH ($p > 0.05$) (Anexo 1, tabla 12).

Los valores bajos de pH se asociaron con el crecimiento de microorganismos productores de ácidos orgánicos, los cuales se vieron favorecidos por un ambiente con bajas concentraciones de oxígeno (Mendonca y col., 1989). Estos resultados estuvieron en concordancia con los de Guerrero-Legarreta y col. (1995) y Minor-Pérez (1998), quienes reportaron reducciones significativas del pH en carne bovina y de cerdo inoculada con bacterias lácticas.

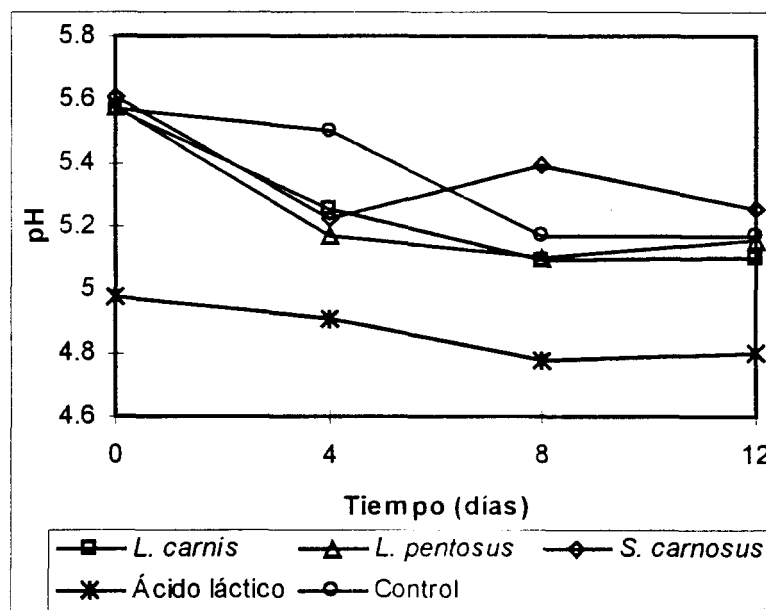


Figura 11: Evolución del pH en carne almacenada a 4 °C

Como se expuso en la revisión bibliográfica, se han propuesto muchas teorías para explicar el mecanismo de acción antibacteriano del ácido láctico, siendo la más aceptada la capacidad del ácido para atravesar la membrana celular en su forma no disociada,

disociarse en el interior celular y generar, como consecuencia, una caída del pH intracelular (Shelef, 1994; Brul y Coote, 1999). La proporción del ácido láctico no disociado aumenta conforme disminuye el pH, por lo que la contribución del pH cárnico en la eficiencia bacteriostática no puede ser ignorada. Los bajos niveles de pH presentados en la carne tratada con ácido láctico genera que una gran proporción del ácido orgánico se presente en su forma no disociada, lo que explicaría la gran capacidad antibacteriana mostrada por dicho compuesto.

El pH de los alimentos tiene un profundo efecto sobre el crecimiento microbiano y la producción de metabolitos. El pH óptimo de crecimiento para *Pseudomonas* spp. es de 5 a 9 (Holts y col., 1994), mientras que *B. thermosphacta* no es capaz de crecer con valores inferiores a 5.5 (Dainty y col., 1983; Nychas y col., 1988), lo que puede explicar los bajos recuentos obtenidos para estas bacterias en las muestras tratadas con ácido láctico o con bacterias biopreservantes. El crecimiento inicial de *B. thermosphacta* observado en la carne control (figura 9e) puede ser explicado porque el pH no se redujo durante los primeros 4 días de almacenamiento, superando el valor crítico de 5.5. Posteriormente el pH cárnico disminuyó, provocando una declinación paralela en la concentración de *B. thermosphacta* al final del periodo de almacenamiento.

Algunas enterobacterias (*Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Hafnia* spp., *Citrobacter* spp.) necesitan pHs superiores a 5.5 para crecer en alimentos almacenados bajo vacío (Nychas y col., 1988). No obstante, este grupo microbiano presentó crecimientos importantes a los bajos niveles de pH alcanzados en el experimento. Adicionalmente, las enterobacterias fueron los únicos microorganismos alterantes capaces de crecer en la carne tratada con ácido láctico con niveles de pH inferiores a 5. Esto estaría evidenciando una importante respuesta adaptativa a las condiciones de mediana acidez, que pudiera englobar también la resistencia a otras barreras de control microbiano (calor, concentración de sales, antibióticos, etc.) aplicadas simultáneamente (Gill y Newton, 1980; Rowan, 1999). Para lograr esta adaptación a condiciones de mediana acidez, los microorganismos sintetizan proteínas específicas de membrana e incrementan la hidrofobicidad superficial y la formación de biopelículas (Leyer y Johnson, 1993). Nissen y col. (2001) hallaron que la

descontaminación con ácido láctico provocaba una reducción de la flora nativa de la carne y un incremento importante en las poblaciones de enterobacterias, como resultado de la disminución de la flora competitiva. Por ello, sería aconsejable combinar la aplicación de ácido láctico con el inóculo de bacterias bioprotectoras para recolorizar la superficie cárnica con microorganismos deseables.

6.2.2 Carne almacenada a 20 °C

Únicamente en los experimentos en los que la carne se trató con ácido láctico se observaron reducciones significativas del pH ($p > 0.001$), mostrando valores inferiores a 4.7 a las 48 horas de almacenamiento en esta temperatura. Las bacterias lácticas también redujeron el pH, aunque no significativamente ($p > 0.289$) en comparación con el control (figura 12) (Anexo 1, tabla 12). El valor de pH de la carne tratada con cultivos bioprotectores se redujo en los primeros dos días (en aproximadamente 0.6 unidades) y luego mostró un incremento constante, alcanzando al final del período de almacenamiento niveles similares a los iniciales. De acuerdo con Gill y Newton (1980), la carne presenta bajos niveles de carbohidratos y se puede detectar una reducción en la concentración de glucosa cuando la densidad celular de *Lactobacillus* spp. se aproxima al máximo nivel. Cuando la concentración de glucosa disminuye, el ácido láctico y los aminoácidos son metabolizados por las bacterias alterantes (especialmente *Pseudomonas* spp. y enterobacterias) con la generación de amoníaco y la consecuente elevación del pH (Wing y col., 1983; Greer, 1988 y 1989). Según lo reportado por Gill (1976), a una densidad celular superior a 8 ordenes de magnitud el pH cárnico y la concentración de amonio comienzan a aumentar y a la máxima densidad celular el pH puede ser de 1.1 unidades por sobre el pH inicial.

La elevación del pH hacia el final del período de almacenamiento podría ser la causa del incremento detectado en la carne control del número de *B. thermosphacta* (figura 10), al encontrar condiciones ambientales más propicias para su multiplicación (Nychas y col., 1988).

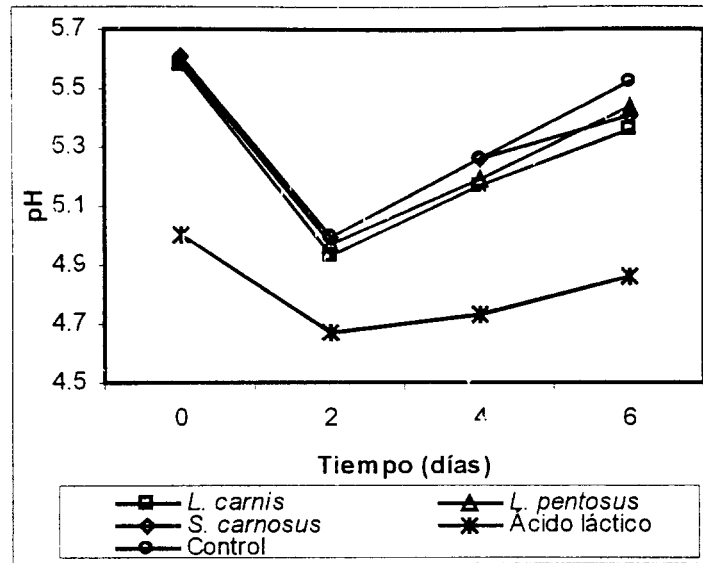


Figura 12: Evolución del pH en carne almacenada a 20 °C.

6.3 Actividad lipolítica

Como resultado de la actividad lipolítica de origen endógeno o exógeno, se generan ácidos grasos libres que incrementan la susceptibilidad de la carne a sufrir procesos oxidativos. Estas reacciones ocasionan alteraciones en las características organolépticas de la carne cruda (Hernández y col., 1998). Los ácidos grasos estudiados en el presente trabajo fueron el oléico, el palmítico y el esteárico, que representan aproximadamente el 85% de los ácidos grasos que componen la porción lipídica de la carne bovina.

Considerando en conjunto la evolución de los ácidos grasos libres en carne bovina inoculada con los tres microorganismos alterantes, no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos, en cuanto a las variaciones en la concentración de ácido palmítico ($p > 0.768$), esteárico ($p > 0.870$) y oléico ($p > 0.950$). Tampoco se hallaron diferencias significativas en la concentración de ácidos grasos libres en función del tiempo de almacenamiento ($p > 0.717$ para el ácido palmítico, $p > 0.850$ para el ácido esteárico y $p > 0.903$ para el ácido oléico).

6.3.1 Carne almacenada a 4 °C

Analizando la información sobre actividad lipolítica en carne inoculada con *B. thermosphacta* (el único de los microorganismos alterantes empleados con capacidad lipolítica) los resultados fueron diferentes. Se observó (figura 13) una disminución estadísticamente significativa en función de las concentraciones de ácido palmítico ($p > 0.05$) y esteárico ($p > 0.05$) en carne sometida a los diferentes tratamientos ácido lácticos (Anexo 1, tablas 13, 14 y 15). La elevación en la carne control de la concentración de estos ácidos grasos libres se hizo evidente a partir del cuarto día de almacenamiento bajo refrigeración, alcanzando sus máximas concentraciones al octavo día y disminuyendo posteriormente hasta el final del estudio.

Según lo expuesto en la sección 6.1.1 (análisis microbiológico), *B. thermosphacta* muestra una elevación importante en su concentración en la carne control hacia el cuarto día de almacenamiento para disminuir posteriormente. *B. thermosphacta* es un microorganismo muy sensible a las variaciones del pH, tanto en lo que respecta a su multiplicación como en su actividad lipolítica. Se ha reportado que el pH óptimo para crecimiento y producción de lipasas es de 7. No obstante, cuando el pH decrece hasta valores cercanos a 5.5, la producción de lipasa solo se reduce un 30% (a pesar de que el crecimiento microbiano sufre una inhibición superior al 70%), generándose gran cantidad de lipasa por mg de proteína producida (Papon y Talon, 1988 y 1989). Estos datos apoyarían la hipótesis de que, aun cuando la reducción en el pH cárnico limita la multiplicación de *B. thermosphacta*, ésta es capaz de producir suficiente cantidad de enzima como para generar las elevadas concentraciones de ácidos grasos libres observadas.

Papon y Talon (1988) observaron que la curva de producción de lipasa por parte de *B. thermosphacta* presenta dos elevaciones. Una ocurre durante la fase exponencial de crecimiento y la segunda alcanza su máximo en la fase estacionaria temprana. La producción de lipasa en la fase estacionaria temprana de crecimiento, estaría ocasionada por el efecto inductor generado por la disminución de la glucosa disponible (Papon y Talon, 1988). Existe, por lo tanto, concordancia entre la curva de crecimiento de *B. thermosphacta* y la producción de ácidos grasos libres observada en el presente trabajo.

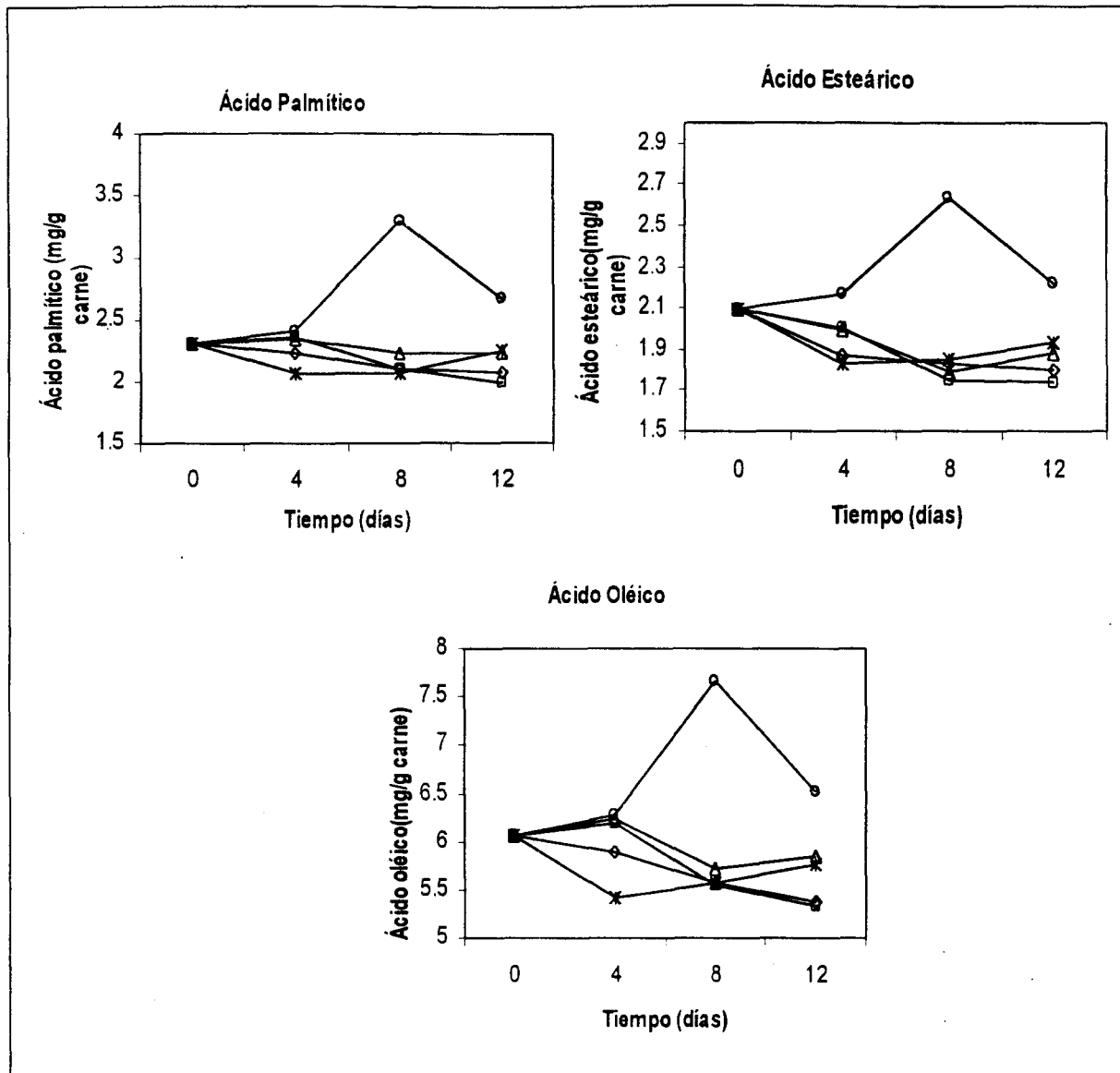


Figura 13: Concentración de ácidos grasos libres (mg/g) en carne inoculada con *B. thermosphacta* y almacenada a 4 °C

Referencias : □, *L. carnis*; Δ, *L. pentosus*; ◇, *S. carnosus*; *, ácido láctico; O, control.

Los tratamientos ácido lácticos presentaron una leve disminución en la concentración de los diferentes ácidos grasos libres analizados a lo largo del almacenamiento bajo refrigeración, resultando no significativos desde el punto de vista estadístico (ácido palmítico $p > 0.537$, ácido esteárico $p > 0.252$ y ácido oléico $p > 0.551$). Estos datos están en contraposición con los presentados por Minor-Pérez en muestras de carne de cerdo (1998), quien encontró elevaciones en la concentración de diferentes ácidos grasos libres inoculadas con cultivos bioprotectores y almacenadas al vacío. La actividad

lipolítica de las bacterias lácticas contribuye al aroma y sabor de los productos fermentados (Johansson y col., 1994), pero esta condición no es deseable en la preservación de carne cruda. Este hecho pone de relieve la importancia de seleccionar cultivos bioprotectores con limitada (o ausente) capacidad lipolítica (Kenneally y col., 1998b).

La concentración de ácido oléico encontrada en la carne control fue mayor, pero este dato no resultó ser estadísticamente significativo ($p > 0.09$) (Anexo 1, tabla 14). De todas formas, la evolución de las concentraciones de dicho ácido graso libre es semejante a la evidenciada por los otros dos ácidos grasos estudiados.

6.3.2 Carne almacenada a 20 °C

La concentración de ácidos grasos libres fue superior en la carne control, pero tampoco este dato fue estadísticamente significativo con respecto a los otros tratamientos (ácido palmítico $p > 0.103$, ácido esteárico $p > 0.371$ y ácido oléico $p > 0.207$) (Anexo 1, tablas 16, 17 y 18). El incremento en las concentraciones de ácido palmítico y oléico se produjo a partir del segundo día de almacenamiento, observándose posteriormente una disminución en sus concentraciones, debido posiblemente a un consumo por parte de la flora microbiana o a procesos de autooxidación, con la consecuente producción de aldehídos y cetonas (Johns y col., 1989, Johansson y col., 1994) (figura 14).

Los tratamientos ácido lácticos no muestran cambios estadísticamente significativos en las concentraciones de ácidos grasos libres, aunque es posible observar disminuciones en las cantidades de los ácidos palmítico, esteárico y oléico a lo largo del período de almacenamiento. Este comportamiento contradice lo reportado previamente por Minor-Pérez (1998) en muestras de carne de cerdo, quien describe elevaciones en la concentración de ácidos grasos libres inoculadas con bacterias bioprotectoras y almacenadas bajo condiciones de abuso térmico.

El crecimiento de *B. thermosphacta* fue muy escaso durante todo el período de almacenamiento, motivado fundamentalmente por el rápido descenso del pH cárnico a valores inferiores a 5. A pesar de lo comentado anteriormente, la actividad lipolítica de *B.*

thermosphacta y la estabilidad de las enzimas se reducen drásticamente cuando el pH de la carne desciende por debajo de 5.5 (Papon y Talon, 1988 y 1989), pudiendo ser éstas las razones por las que las concentraciones de ácidos grasos libres no se modifican a lo largo del almacenamiento.

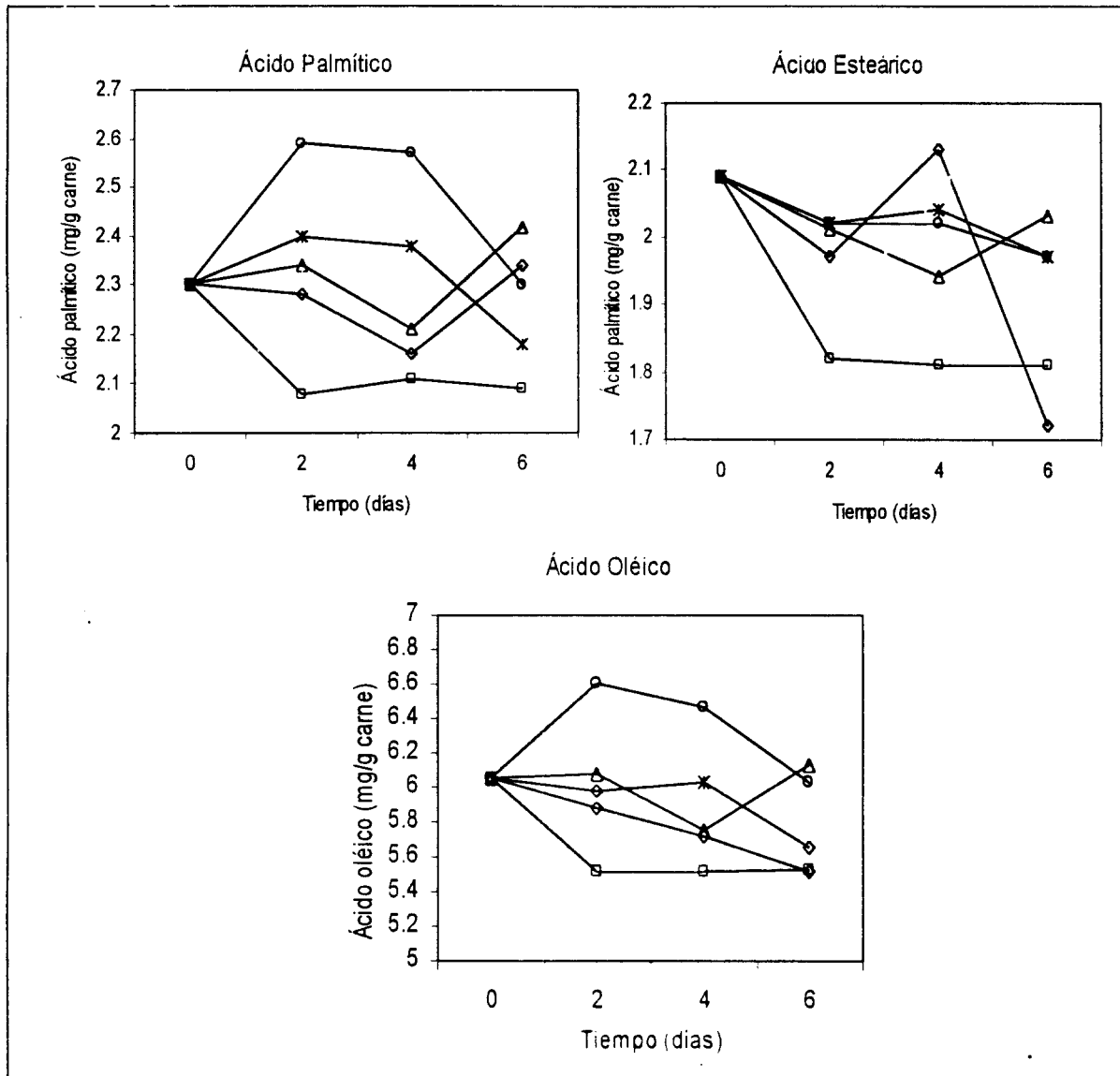


Figura 14: Concentración de ácidos grasos libres (mg/g) en carne inoculada con *B. thermosphacta* y almacenada a 20 °C

Referencias : □, *L. carnis*; Δ, *L. pentosus*; ◇, *S. carnosus*; *, ácido láctico; O, control.

6.4 Actividad aminodescarboxilasa

Se han reportado correlaciones significativas entre la calidad microbiológica de la carne y la concentración de aminas biogénicas. Los niveles de putrescina, cadaverina y

tiramina mostraron una correlación significativa con el tiempo y temperatura de almacenamiento de la carne fresca. Poblaciones de coliformes superiores a 5 log/g de carne fresca se han asociado de forma positiva con aumentos en la concentración de cadaverina y una carga de psicrótrofos superior a 5 log/g es necesaria para observar incrementos en la concentración de putrescina (Halász y col., 1994; Byun y col., 2000). Definir los niveles tóxicos de cada amina biogénica es sumamente complicado, porque depende de las características individuales de cada una de ellas y de la presencia simultánea de otras aminas biogénicas (Silla-Santos, 1996). Concentraciones de histamina superiores a 100 mg/100g de carne han sido definidas como altamente peligrosas para la salud del consumidor; los niveles tolerados de tiramina en carne fresca se encuentran entre 100-800 mg/Kg y se ha reportado que una concentración total de aminas biogénicas de hasta 5 mg/Kg puede definirse como indicativo de una alta calidad microbiológica de los productos (Hwang y col., 1995; Silla-Santos, 1996; Hernández-Jover, 1997).

6.4.1 Carne almacenada a 4 °C

La concentración de histamina fue superior en la carne control, aunque dicho aumento no resultó estadísticamente significativo ($p > 0.268$) (Anexo 1, tabla 16). Bauer y col. (1994) y Roig-Sagués y Eerola (1997) tampoco encontraron reducción en la concentración de histamina en carne por la adición de cultivos bioprotectores. Es interesante destacar que en la carne control la elevación de dicha amina biogénica se presentó a partir del cuarto día de almacenamiento, mientras que en los tratamientos ácido lácticos se incrementó más tardíamente su concentración (figura 15a). Las concentraciones observadas durante el período de almacenamiento bajo refrigeración coinciden con lo reportado en la literatura (Edwards y col., 1987; Halász y col., 1994; Eerola y col., 1996 y Hernández-Jover y col., 1997).

Los tratamientos ácido lácticos no mostraron tampoco un efecto significativo para reducir la concentración de tiramina en carne cruda almacenada a esta temperatura ($p > 0.262$) (Anexo 1, tabla 17). Esta amina biogénica presentó un incremento en su concentración a partir del cuarto día de almacenamiento bajo refrigeración, permaneciendo en valores relativamente constantes hasta el final del estudio (figura 15b). Bauer y col.

(1994) y Roig-Sagués y Eerola (1997) tampoco hallaron reducción en la concentración de tiramina con la adición de bacterias lácticas, concluyendo que la inclusión de cultivos bioprotectores no es una garantía para prevenir la formación de aminas biogénicas. Es probable que la flora nativa de la carne fuera la responsable de la elevación en los niveles de tiramina, ya que los cultivos bioprotectores no presentaban actividad descarboxilante *in vitro* frente a tirosina.

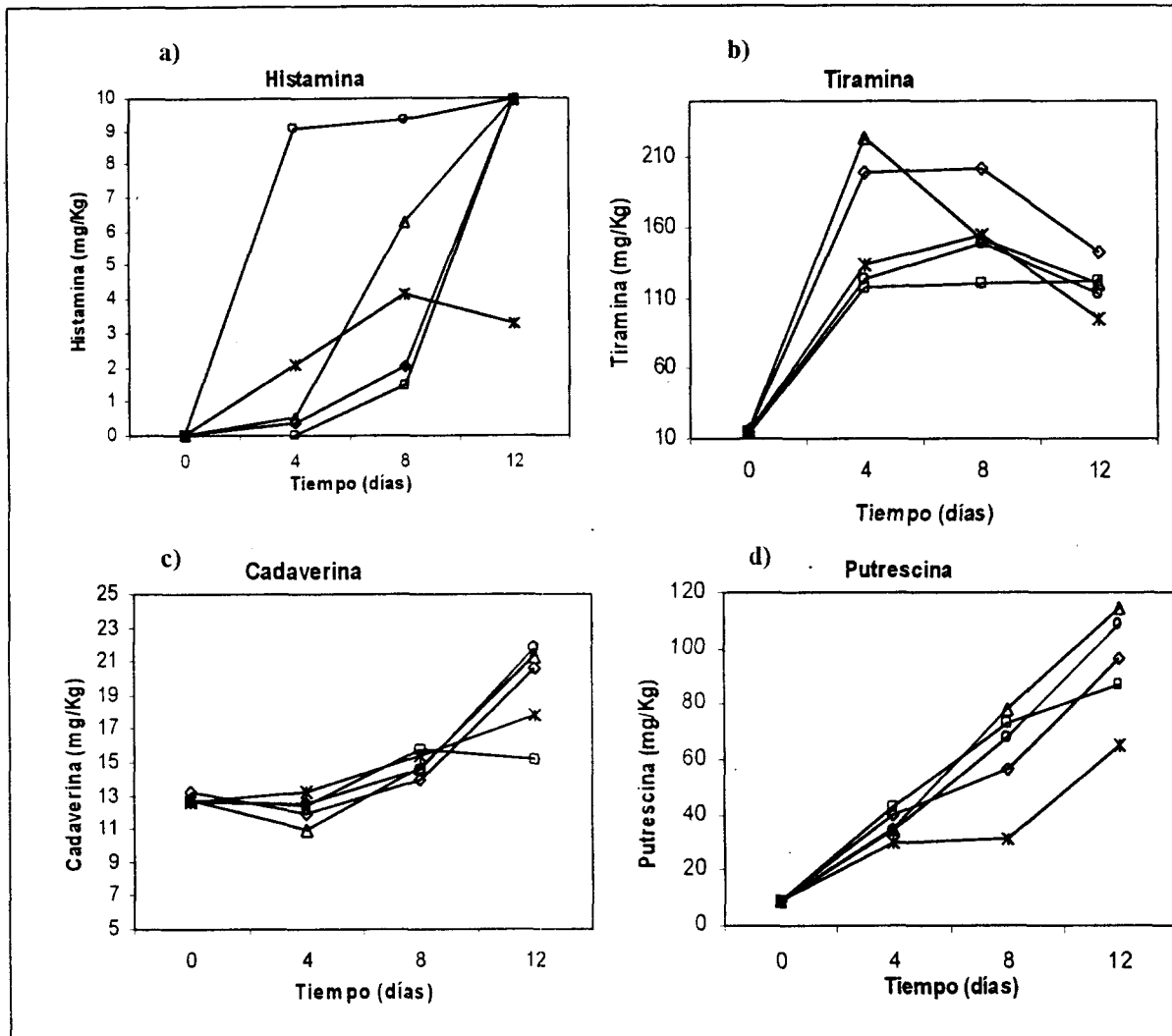


Figura 15: Concentración de aminas biogénicas en carne almacenada a 4 °C
 Referencias : □, *L. carnis*; Δ, *L. pentosus*; ◇, *S. carnosus*; *, ácido láctico; O, control.

La concentración de cadaverina no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados ($p > 0.597$) (Anexo 1, tabla 19). Los tratamientos ácido lácticos no lograron reducir su concentración con respecto a la carne

control, lo que se contradice con Quintero-Salazar (2001), quien reporta reducciones significativas en la concentración de cadaverina en carne de pollo mediante el empleo de cultivos bioprotectores y nisina, posiblemente debido a la adición de azúcar sobre la superficie cárnica y al empleo directo de la bacteriocina. A lo largo del período de almacenamiento, la concentración de cadaverina mostró leves incrementos siendo el aumento más marcado a partir del día 12 de almacenamiento (figura 15c).

La carne tratada con ácido láctico provocó la aparición de concentraciones de putrescina significativamente ($p > 0.05$) menores que las de los restantes tratamientos (figura 15d). Los cultivos bioprotectores, por el contrario, se mostraron ineficientes para reducir la concentración de esta amina biogénica con respecto a la carne control ($p > 0.317$) (Anexo 1, tabla 18). Estos resultados se contradicen con los reportados por Quintero-Salazar (2001) quien observó reducciones significativas en la concentración de putrescina en carne de pollo, mediante el empleo de cultivos bioprotectores y nisina, posiblemente por las causas anteriormente mencionadas. Algunos autores (Dainty y col., 1986; Edwards y col., 1987; Bover-Cid y col., 2001) señalan que la producción de putrescina se da fundamentalmente por la asociación entre bacterias lácticas y enterobacterias, mediante la cual las bacterias lácticas descarboxilan la arginina hasta ornitina y las enterobacterias descarboxilan esta última originando putrescina. Es posible suponer que la interacción de la flora láctica nativa y las enterobacterias presentes en la carne haya generado un incremento en la concentración de putrescina, tornando ineficiente la acción de los cultivos bioprotectores. A pesar de que la población de enterobacterias se vio reducida por acción de los tratamientos con bacterias ácido lácticas es probable que esta disminución no haya sido suficiente como para limitar la generación de putrescina. El tratamiento con ácido láctico, por el contrario, podría haber logrado reducir la concentración de putrescina al controlar tanto la población de bacterias lácticas como la de enterobacterias.

En el presente trabajo, la concentración de putrescina superó a la de cadaverina, hecho que se contradice con lo reportado por algunos autores (Dainty y col., 1986; Halász y col., 1994), que afirman que los niveles de cadaverina son superiores a los de putrescina en carne cruda. Esto estaría sugiriendo la presencia de una microflora nativa particularmente

especializada en la descarboxilación de la arginina o la existencia de una interacción entre diferentes grupos microbianos que, en conjunto, generen una mayor producción de putrescina, tal como lo sugieren Dainty y col. (1986), Edwards y col. (1987) y Bover-Cid y col. (2001).

6.4.2 Carne almacenada a 20 °C

Los tratamientos ácido lácticos se mostraron eficientes para reducir la concentración de histamina con respecto a la muestra control ($p > 0.001$) (figura 16a) (Anexo 1, tabla 16). Majjala y col. (1995) reportan resultados similares respecto de la producción de histamina, concluyendo que el empleo de cultivos bioprotectores puede ser utilizado, con efectos benéficos, para controlar la formación de histamina. Resultados similares fueron reportados por Guillén-Velasco y col. (2001), controlando la producción de histamina en carne de pescado mediante la adición de una cepa de *S. carnosus* como cultivo bioprotector.

El tratamiento de la carne con ácido láctico fue el único capaz de reducir de forma significativa la concentración de tiramina con respecto al control ($p > 0.05$). La carne control mostró los niveles superiores de esta amina pero no fueron estadísticamente significativas con respecto a los cultivos bioprotectores ($p = 0.335$) (figura 16b) (Anexo 1, tabla 17). Bauer y col. (1994) hallaron concentraciones similares en carne de cerdo almacenada a 18 °C, a pesar de no incluir microorganismos descarboxilantes de la tirosina como cultivos bioprotectores, por lo que consideran a esta amina biogénica como indicador de deterioro. La descarboxilación de tirosina ha sido relacionada de forma frecuente con las bacterias ácido lácticas (Edwards y col., 1987; Masson y col., 1996), presentando éstas la máxima producción de tiramina a pH de 5.0 (Santos-Buelga y col., 1986; Chander y col., 1989). Si bien las bacterias bioprotectoras inoculadas en la carne no presentaban actividad aminodescarboxilasa *in vitro*, es probable que la flora láctica nativa sea la responsable de la generación de esta amina biogénica al encontrar un ambiente propicio para su producción. Al reducir la población nativa de estas bacterias lácticas, el ácido láctico pudo controlar la generación de tiramina, presentando las concentraciones más bajas de este compuesto.

El ácido láctico fue también el único tratamiento efectivo para reducir la concentración de putrescina en la carne con respecto al control ($p > 0.05$). Los cultivos bioprotectores mostraron concentraciones inferiores a la presentada por el control, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0.417$) (figura 16c) (Anexo 1, tabla 18). La concentración de putrescina se incrementó conforme avanzaba el período de almacenamiento, alcanzando niveles finales muy elevados, concordantes con la apreciación organoléptica. Según Byun y col. (2000) la concentración de aminas biogénicas, especialmente la putrescina, está altamente correlacionada con el recuento de bacterias totales y psicrótrofos totales. Estos resultados coinciden con los de Bauer y col., (1994) y Bover-Cid y col. (2001), quienes reportan un incremento en la producción de putrescina cuando la carne bovina es almacenada a 18 °C, alcanzándose niveles similares a los determinados en el presente trabajo.

La concentración de cadaverina no mostró diferencias significativas al comparar los tratamientos aplicados ($p > 0.657$) (Anexo 1, tabla 19). La concentración de esta amina biogénica se incrementó a medida que transcurría el almacenamiento, (figura 16d) alcanzando hacia el día 12 niveles similares a los reportados por Bauer y col. (1994) en carne porcina almacenada a 18 °C.

Las bacterias que se encuentran frente a una situación estresante, como un ambiente ácido provocado por la adición de un ácido orgánico o por la producción de éste a partir de bacterias ácido lácticas, responden de diferente manera con el objetivo de mantener su pH interno cerca de la neutralidad. Uno de los mecanismos utilizados es la descarboxilación de aminoácidos, con el consumo de un H⁺ en el proceso (Bearson y col., 1997). Las enterobacterias, principales microorganismos descarboxilantes en carnes envasadas al vacío, descarboxilan lisina (con la producción de cadaverina) y arginina (con la producción de agmatina y putrescina). *Salmonella* spp. utiliza principalmente la descarboxilación de lisina, mientras que *Escherichia coli* y *Shigella* spp., entre otros emplean la descarboxilación de arginina como mecanismo principal de homeostasis (Bearson y col., 1997). En el presente trabajo se observó que los principales incrementos se dieron en los

niveles de putrescina, pudiendo inferirse la participación de grupos microbianos específicos en su producción.

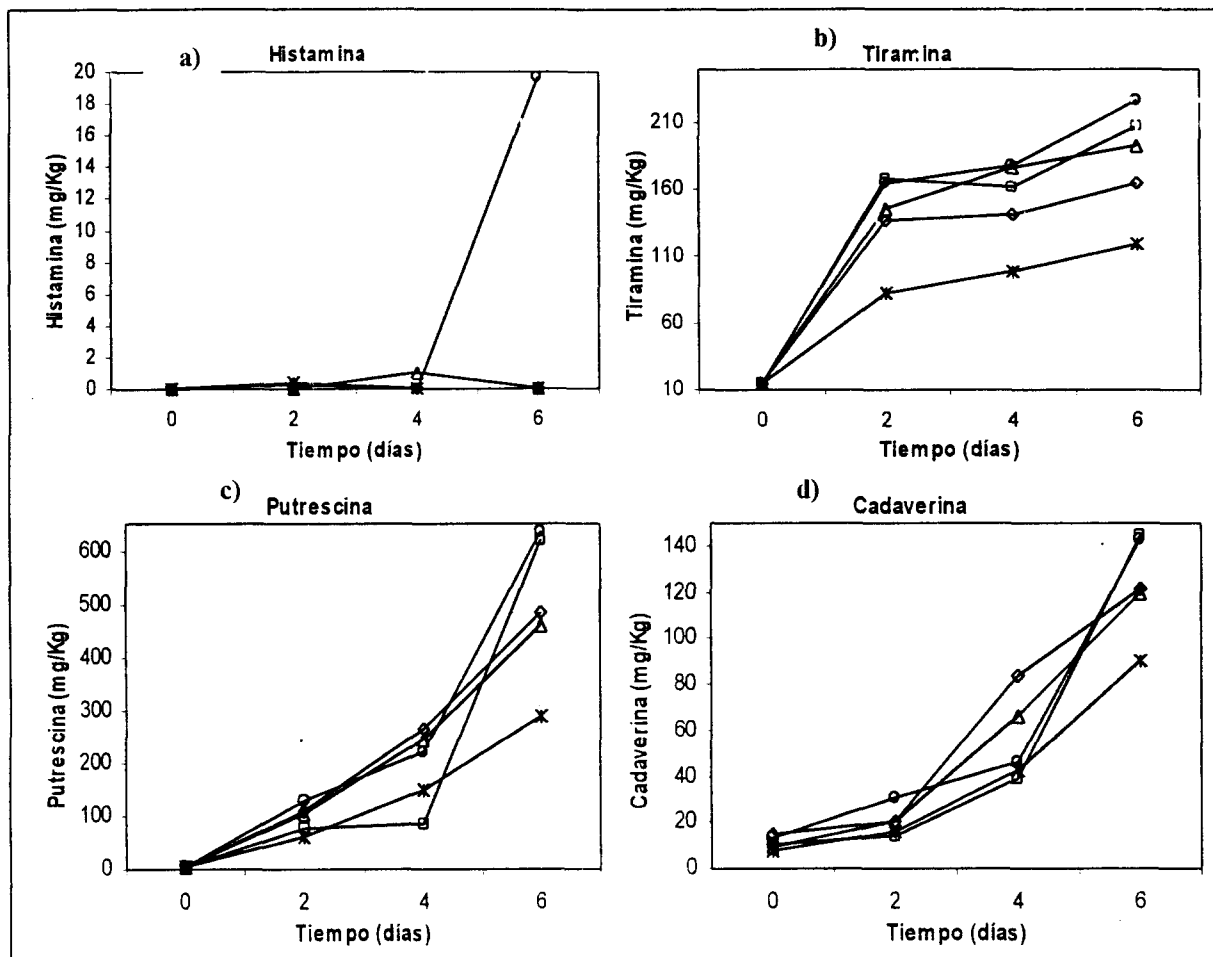


Figura 16: Concentración de aminas biogénicas en carne almacenada a 20 °C.
 Referencias : □, *L. carnis*; Δ, *L. pentosus*; ◇, *S. carnosus*; *, ácido láctico; O, control.

Al igual que lo ocurrido durante el almacenamiento en refrigeración, es probable que el ácido láctico haya conseguido reducir la concentración de putrescina al controlar tanto la población de bacterias lácticas como de enterobacterias. Esto permitiría también explicar la falta de eficiencia por parte de las bacterias bioprotectoras para conseguir reducir los niveles de producción de putrescina.

6.5 Actividad proteolítica

Un número importante de eventos ocurren sobre las proteínas musculares en la carne postmortem. Las proteínas miofibrilares, la desmina, la troponina T, la titina, la nebulina y la vinculina son parcialmente hidrolizadas a consecuencia de la acción de las enzimas endógenas (calpains y catepsinas) del músculo. Adicionalmente, las bacterias contaminantes de la carne pueden producir proteasas (luego que los compuestos de bajo peso molecular han sido completamente consumidos) y utilizar el sustrato proteico como fuente de energía para su crecimiento (Greer, 1989).

Las propiedades funcionales de las proteínas se encuentran relacionadas con sus propiedades fisicoquímicas y estructurales, las cuales pueden modificarse como resultado de la actividad proteolítica ejercida sobre las moléculas proteicas (Hall, 1996).

6.5.1 Carne envasada a 4 °C

Cuando la carne se almacenó bajo condiciones de refrigeración no se evidenció signos de degradación en las principales proteínas miofibrilares, como puede observarse en los geles de electroforesis y densitogramas presentados en el figura 17. Solamente en el día 12 de almacenamiento se aprecia una disminución en la concentración de la cadena pesada de la miosina (flecha a), pequeña pero significativa ($p > 0.003$) (Anexo 1, tabla 20), evidenciándose la aparición de bandas con pesos moleculares de aproximadamente 150 kDa (flecha c). No hubo diferencias significativas entre los diferentes tratamientos aplicados y el control ($p > 0.345$). La molécula de actina (flecha b) se mostró refractaria a la actividad proteolítica durante todo el período de almacenamiento (Anexo 1, tabla 21). Estos datos concuerdan con los de Greer (1989), quien reporta pocos cambios en las principales proteínas miofibrilares cuando la carne se almacena durante 18 días a 5 °C.

Cuando la carne fue inoculada con *P. fluorescens* B52, microorganismo alterante con demostrada actividad proteolítica sobre miosina y actina (Richardson, 1982; Alanís y col., 1999), no se apreció un crecimiento remarcable del microorganismo durante el almacenamiento de la carne bajo refrigeración, en ninguno de los tratamientos evaluados (figura 9d).

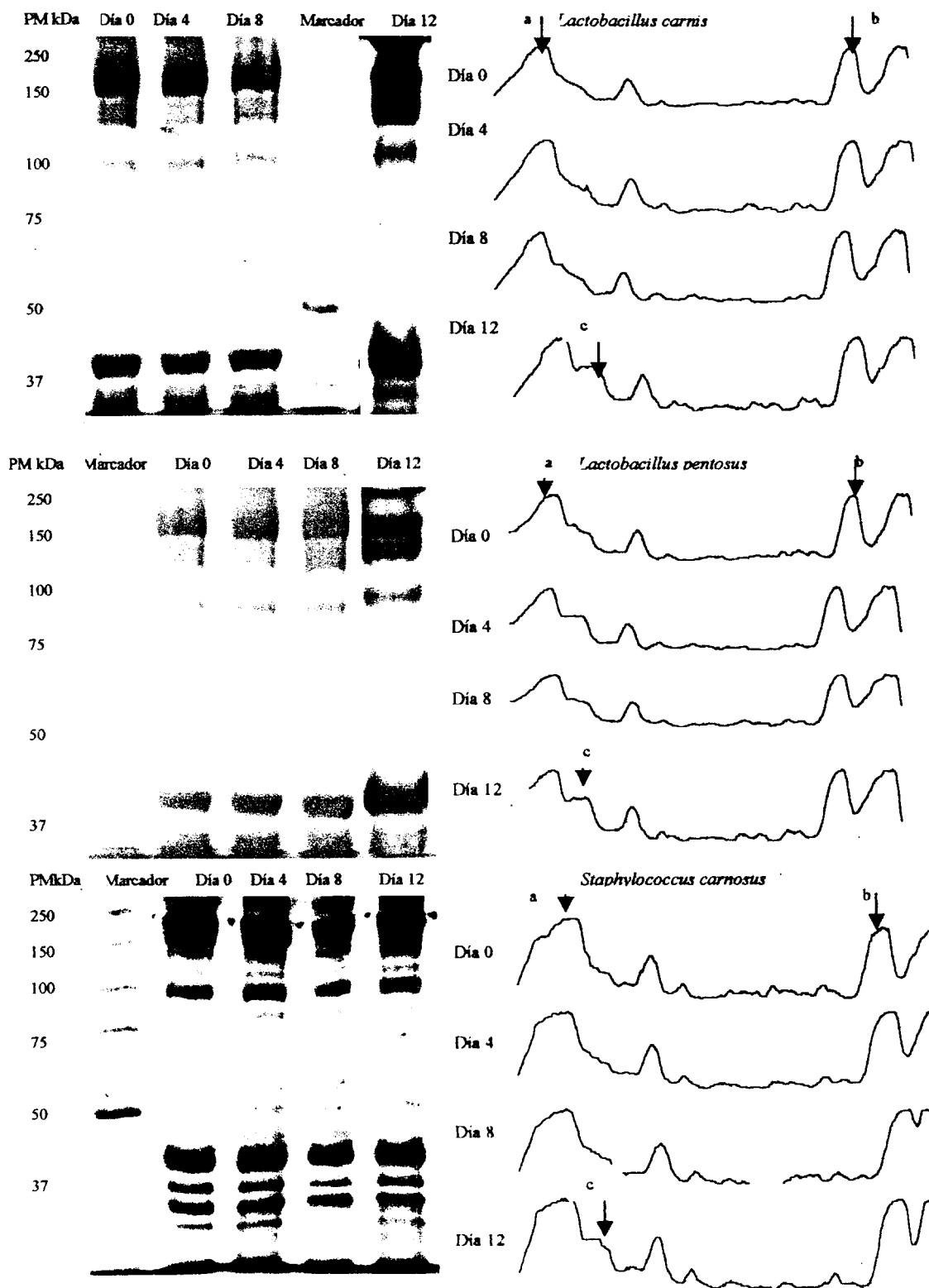


Figura 17: Geles de electroforesis y densitogramas en carne almacenada a 4 °C

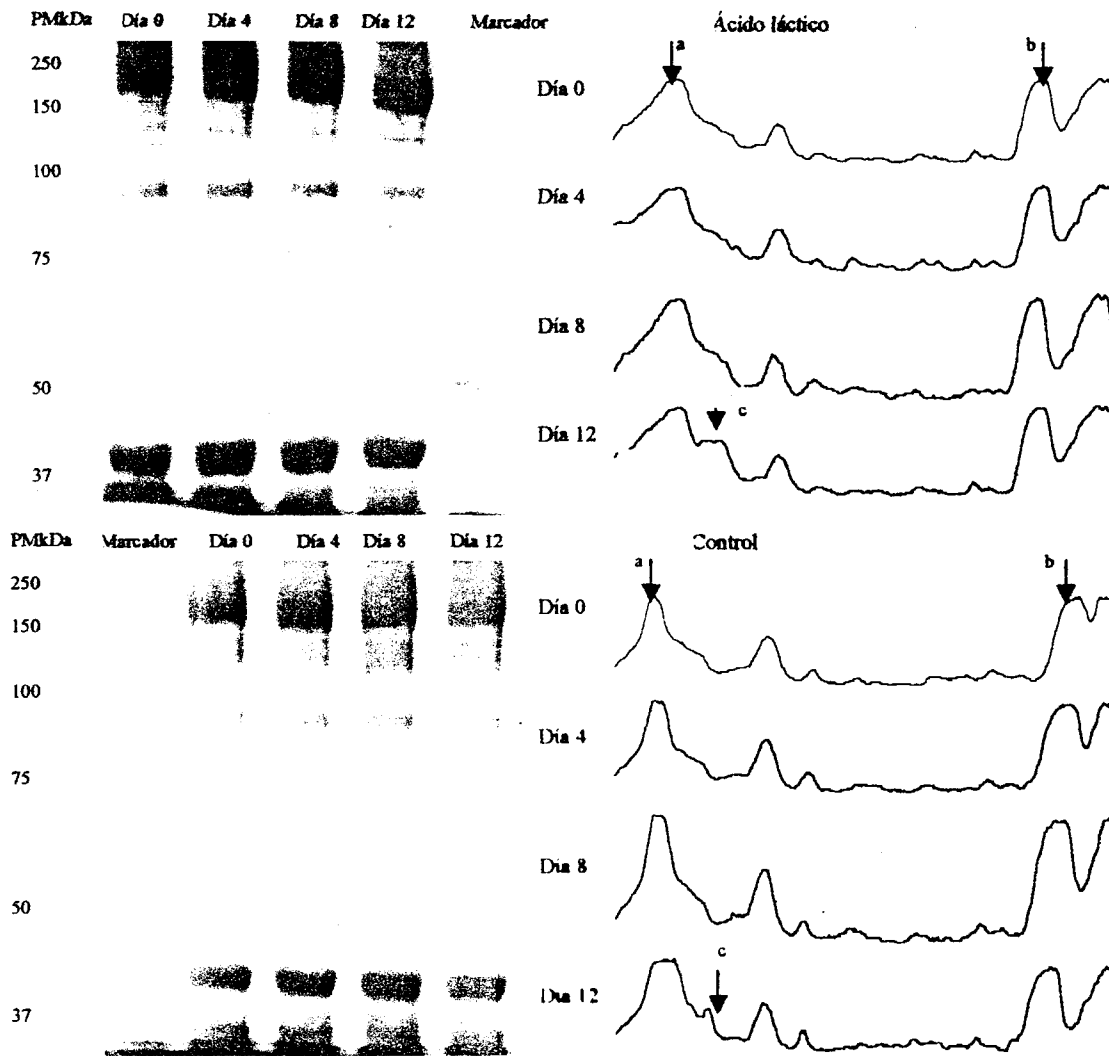


Figura 17: Continuación

Referencias: flecha a, cadena pesada de miosina; flecha b, actina; flecha c, bandas de proteólisis.

La proteasa producida por *P. fluorescens* B52 tiene un peso molecular de 46.8 kDa y presenta su máxima actividad entre 45 y 50 °C, reduciendo su actividad al 29% de su máximo nivel cuando la temperatura declina hasta los 25 °C. Su pH óptimo es de 7, manteniendo buenos niveles de proteólisis entre valores de 6 y 10.5 y viéndose reducida significativamente su actividad enzimática a valores de pH por debajo de 6 (Richardson, 1982). El crecimiento limitado por parte del microorganismo productor de la enzima, la temperatura de refrigeración y los bajos niveles de pH presentados por la carne (4.8-5.6), pudieron reducir o anular la producción y actividad enzimática y, por ende, no observarse cambios proteolíticos significativos en las principales proteínas miofibrilares.

La proteólisis sufrida por la cadena pesada de la miosina hacia el final del período de almacenamiento, observada en todos los tratamientos realizados y el control, podría ser debida a fuentes microbianas diferentes al género *Pseudomonas* o bien a los sistemas enzimáticos endógenos de la carne.

Algunos de los grupos microbianos asociados con actividad proteolítica sobre proteínas miofibrilares, a temperaturas de refrigeración, incluyen a los géneros *Aeromonas* spp., *Achromobacter* spp., *Flavobacterium* spp., *Enterobacter* spp., *Streptococcus* spp. y *Proteus* spp., entre otros (Dainty y col., 1975; Jay y Shelef, 1976). Para los microorganismos de descomposición la glucosa, los aminoácidos y otros compuestos de bajo peso molecular son los principales sustratos a metabolizar, por lo que la actividad proteolítica sobre las proteínas miofibrilares no sería detectable hasta que el número de bacterias alterantes superara los 8 logaritmos por gramo de carne o los sustratos de bajo peso molecular hubieran sido consumidos (Dainty y col., 1975; Gill, 1976; Greer, 1989). Ninguno de los tratamientos aplicados permitió alcanzar niveles de bacterias alterantes cercanos a dicho valor, lo que pondría en duda esa hipótesis. Además, aunque la carne tratada con ácido láctico fue la que mostró la mejor calidad microbiológica, también en este tratamiento se evidenció una leve disminución en la concentración de miosina hacia el final del período de almacenamiento.

Debido al bajo pH cárnico, podría cobrar fuerza la posibilidad de que la actividad proteolítica presentada sobre la cadena pesada de la miosina fuera causada por sistemas enzimáticos endógenos, especialmente del grupo de las catepsinas (Schwartz y Bird, 1977; Zeece y col., 1986 y 1992). Resultados similares fueron descritos por Morzel y col. (2000) y Hwang y col. (2000), observando una reducción de la banda correspondiente a la cadena pesada de la miosina en carne fermentada o tratada con ácidos orgánicos y almacenada en refrigeración.

6.5.2 Carne almacenada a 20 °C

A diferencia de lo observado cuando la carne fue almacenada en refrigeración, las principales proteínas miofibrilares sufrieron una importante degradación a 20 °C.

La carne tratada con ácido láctico fue la que evidenció el mayor grado de proteólisis ($p > 0.001$), no habiéndose encontrado diferencias significativas entre los tratamientos realizados con bacterias bioprotectoras y la carne control ($p > 0.155$) (Anexo 1, tabla 20). La proteólisis de la molécula de miosina se puso de manifiesto desde el comienzo del almacenamiento, degradándose en promedio aproximadamente el 40% de la molécula pesada de miosina hacia el sexto día (figura 18). Como se muestra en los geles de electroforesis y en los densitogramas correspondientes, es evidente la aparición de bandas nuevas con un peso molecular de aproximadamente 100-150 kDa (flecha c) resultantes del proceso de proteólisis sufrida por la cadena pesada de la miosina.

La molécula de actina (flecha b) también sufrió proteólisis, pero menos evidente que la presentada por la miosina. No se observan diferencias significativas entre los tratamientos aplicados y el control ($p > 0.472$). La degradación de esta proteína es evidente hacia el final del período de almacenamiento ($p > 0.003$), mostrándose sin embargo más refractaria a la proteólisis que la miosina (Anexo 1, tabla 21). En la figura 18 aparece una banda adicional, con peso molecular de aproximadamente 35 kDa, hacia el sexto día de almacenamiento y que probablemente sea debida a la degradación de la actina (flecha d).

El perfil electroforético es consistente, independientemente del microorganismo alterante inoculado. Si bien la temperatura de almacenamiento influyó para que *P. fluorescens* B52 (único microorganismo proteolítico empleado) mostrara un crecimiento superior al evidenciado cuando fue incubado bajo refrigeración (figura 10d), el pH de la carne se mostró por debajo del pH óptimo para la actividad de la enzima proteolítica producida por este microorganismo (Richardson, 1982). Además, esta bacteria no mostró crecimiento en la carne tratada con ácido láctico, tratamiento que evidenció el mejor perfil microbiológico pero que, por el contrario, sufrió el mayor grado de proteólisis de todos los tratamientos evaluados. Alanís y col. (1999) reportan, utilizando un extracto enzimático de *P. fluorescens* B52, una extensiva degradación de la miosina y la generación de fragmentos de 120-150 kDa, lo que coincidiría con lo observado en el presente trabajo; pero destaca además una importante e inmediata proteólisis de la molécula de actina, contrastando con la pobre y tardía degradación observada en el presente trabajo.

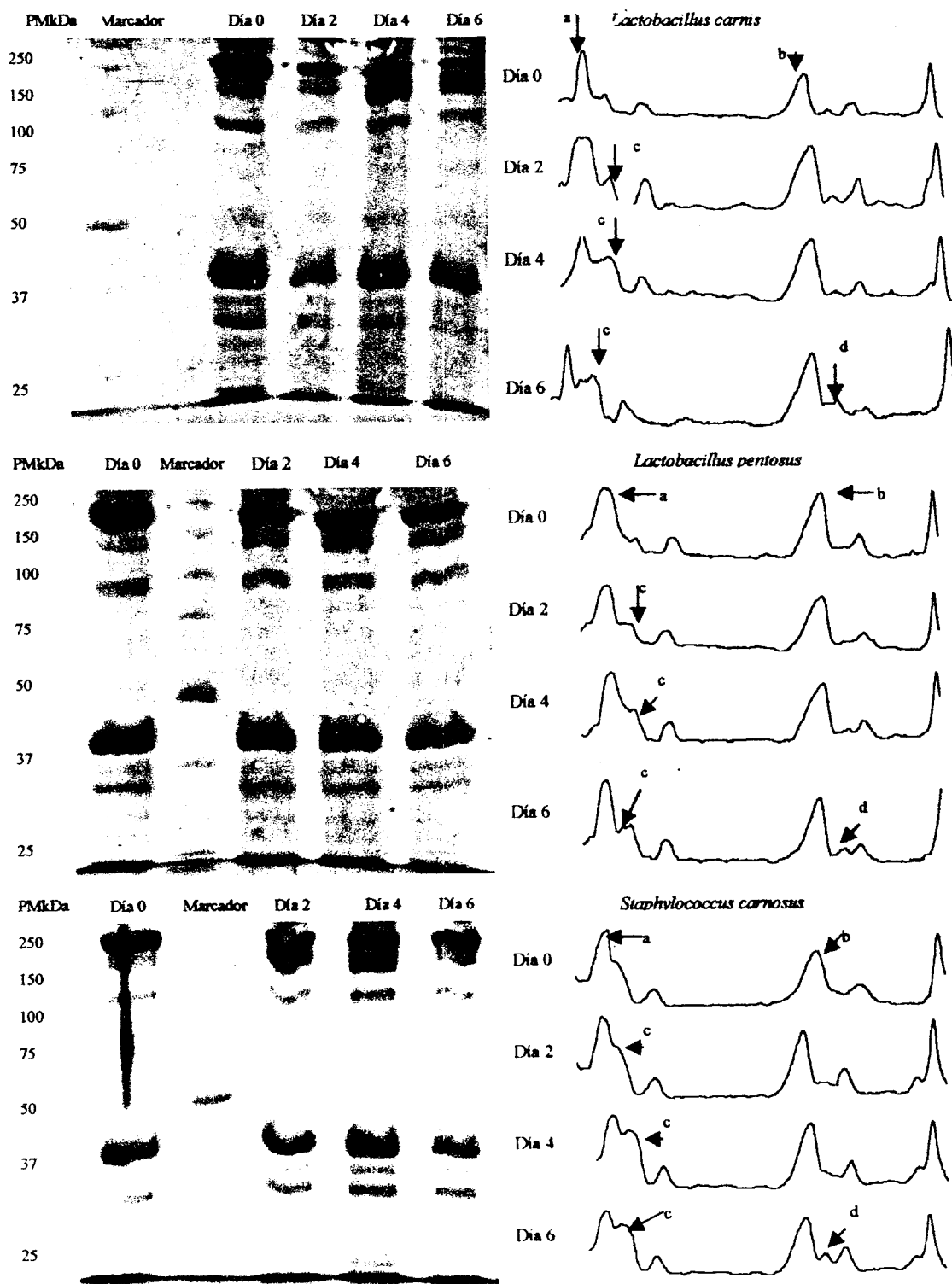


Figura 18: Geles de electroforesis y densitogramas en carne almacenada a 20 °C

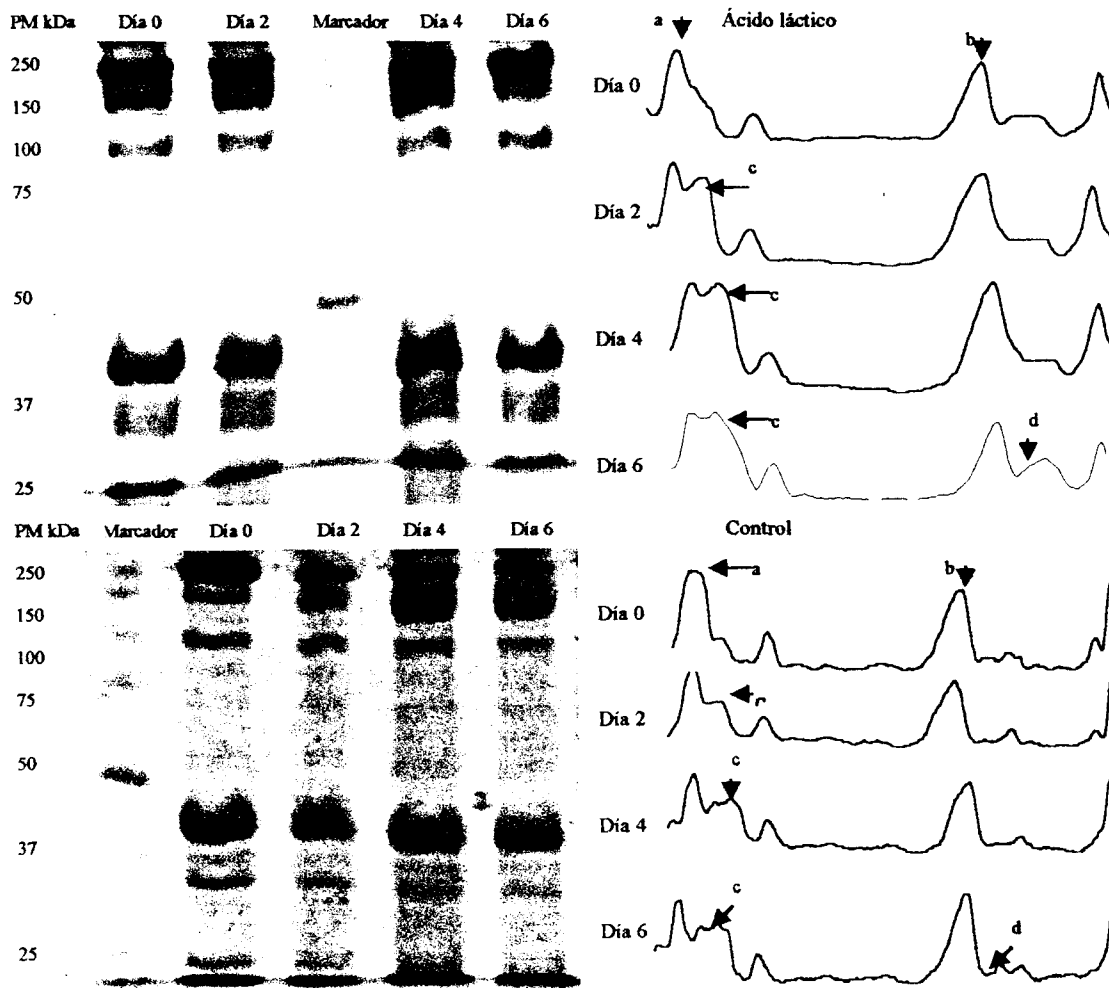


Figura 18: Continuación

Referencias: flecha a, cadena pesada de miosina; flecha b, actina; flecha c, bandas de proteólisis en la cadena pesada de miosina; flecha d, banda de proteólisis en actina.

Por lo anteriormente expuesto, resulta evidente que el origen de la proteólisis sufrida por la carne almacenada a 20 °C no es microbiológico sino endógeno, al igual que ocurría en refrigeración. Resultados similares han sido descritos por Morzel y col. (2000) y Hwang y col. (2000), a partir de carne de pescado sometida a fermentación láctica y carne de ave tratada con ácido láctico, respectivamente. En estos trabajos se concluyen que la proteólisis sufrida por las proteínas miofibrilares en las muestras no es de origen bacteriano, sino que es debida al sistema de enzimas proteolíticas presentes en la propia célula muscular (especialmente las catepsinas).

Las enzimas lisosomales (catepsinas) constituyen un importante grupo de proteasas y representan una ruta significativa para la degradación proteica en el músculo *in vivo* y para el ablandamiento de la carne postmortem (Yu y Lee, 1986; Zeece y col., 1992). Las catepsinas más importantes encontradas en el músculo son la B, H, L y D, con intervalos de pH óptimo para su actividad entre 3.0 y 6.0, excepto la catepsina H que es activa a valores de pH entre 5.5 y 6.5. La hidrólisis de la cadena pesada de la miosina es diferente según el tipo de catepsina que la realice. La catepsina D hidroliza la molécula entre las cabezas globulares y la cola de la miosina, generando fragmentos de aproximadamente 120 y 90 kDa (Saunders, 1994). En contraste, la catepsina B actúa en el sitio de unión de la meromiosina pesada y ligera obteniéndose fragmentos heterogéneos de polipéptidos (10-50 kDa) y un producto mayor de 150 kDa, resistente a mecanismos proteolíticos adicionales. La catepsina L hidroliza la molécula de miosina inicialmente a la altura de las cabezas globulares (como lo hace la catepsina D) para posteriormente degradar de forma más extensiva y generar fragmentos con un peso molecular dentro del rango de 67-90 kDa (Schwartz y Bird, 1977; Zeece y col., 1992; Saunders, 1994). Las catepsinas no limitan su actividad a la miosina: actina, tropomiosina, troponina, titina, colágeno y elastina sufren asimismo su acción proteolítica. La actividad enzimática de estas proteínas es directamente proporcional a la temperatura, obteniéndose mayor degradación cuando la carne es almacenada a temperatura ambiente que cuando se conserva bajo refrigeración (Yu y Lee, 1986; Zeece y col., 1986; Etherington, 1987) Los productos principales de degradación son insolubles en soluciones de baja fuerza iónica (Zeece y col., 1986).

El pH de la carne permaneció en un nivel inferior a 5.5 durante todo el estudio, encontrándose por debajo de 5.0 desde el segundo día de almacenamiento, en todos los tratamientos evaluados. Los bajos niveles de pH (que se hallaron dentro del rango óptimo de la actividad enzimática de las catepsinas), sumados al almacenamiento bajo condiciones de abuso térmico, pudieron coadyuvar para que la actividad proteolítica endógena fuera tan importante, como lo reflejan los geles de electroforesis y densitogramas (figura 18).

6.6 Solubilidad proteica

La solubilidad es una importante propiedad que gobierna el comportamiento funcional de las proteínas (por ejemplo, la emulsificación y la gelificación) y su potencial aplicación al procesamiento de alimentos. Generalmente, las proteínas solubles poseen atributos funcionales superiores para aplicaciones en la industria alimenticia. La solubilidad se encuentra relacionada con las condiciones ambientales que rodean a la proteína, como el pH, la fuerza iónica, así como por la distribución de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos superficiales que pueden sufrir alteraciones como consecuencia de procesos de desnaturalización proteica (Vojdani, 1996).

6.6.1 Carne almacenada a 4 °C

La carne tratada con ácido láctico presentó los menores niveles de solubilidad ($p>0.006$) a lo largo de todo el almacenamiento. Los restantes tratamientos no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto del control ($p>0.763$). Independientemente del valor de solubilidad alcanzado en cada uno de los tratamientos, el porcentaje de proteína soluble sufrió pocas modificaciones a lo largo del almacenamiento, alcanzándose la máxima solubilidad en el día 4 y presentándose diferencias significativas ($p>0.026$) sólo entre este y el último día de almacenamiento en refrigeración (Anexo 1, tabla 22) (figura 19).

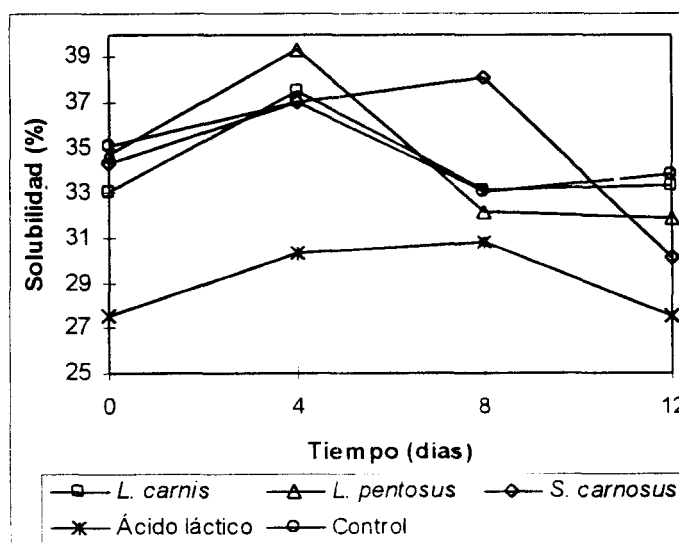


Figura 19: Solubilidad de las proteínas miofibrilares en carne almacenada a 4 °C

Debido a la naturaleza anfotérica de las proteínas, su solubilidad está muy influenciada por el pH al que se encuentren, siendo mínima en su punto isoeléctrico (pI) y aumentando al alejarse de él. Dependiendo del pH del sistema, estos polímeros pueden actuar como cationes y aniones, de tal manera que al desarrollar la misma carga eléctrica provocan fuerzas de repulsión entre ellos que repercute en un aumento de la solubilidad y estabilidad. En el pI, dichas fuerzas son mínimas con lo que se favorecen las interacciones proteína-proteína, se induce la agregación y la consecuente insolubilización final (Hall, 1996). El pH cárnico siempre se mantuvo dentro del intervalo del pI de las proteínas miofibrilares (5.0-5.5) (Wismer-Pedersen, 1994), siendo éste un factor determinante a la hora de explicar el comportamiento de la solubilidad en las proteínas cárnicas. El pH de la carne tratada con ácido láctico fue el más bajo de todos los tratamientos realizados (ver sección 6.2.1), lo que podría explicar la menor solubilidad observada el último día de almacenamiento alcanzándose el valor más bajo de pH para todos los tratamientos realizados, pudiendo sugerirse cierto grado de desnaturalización proteica por exposición a ácidos, lo que explicaría la reducción en la solubilidad observada hacia el final del almacenamiento.

6.6.2 Carne almacenada a 20 °C

La solubilidad de las proteínas miofibrilares fue semejante entre los diferentes tratamientos evaluados, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p > 0.872$).

El comportamiento de la solubilidad a lo largo del período de almacenamiento bajo condiciones de abuso térmico fue similar entre los diferentes tratamientos, hallándose un efecto significativo del tiempo de almacenamiento ($p > 0.001$) (Anexo 1, tabla 22). La mayor solubilidad se presentó al inicio del experimento ($p > 0.001$), disminuyendo el segundo día de almacenamiento, incrementándose el porcentaje de solubilidad al cuarto día, para caer finalmente al final del período de almacenamiento, con porcentajes de solubilidad inferiores a los mostrados en el segundo día pero sin que exista una diferencia estadísticamente significativa entre ellos ($p > 0.289$) (figura 20).

Chen y col. (1981) reportan incrementos en la solubilidad de las proteínas miofibrilares que sufrieron un ataque proteolítico de origen microbiano o endógeno. Zeece y col. (1986) reportan que los fragmentos proteicos obtenidos después de una proteólisis endógena son esencialmente insolubles en soluciones salinas diluidas. A pesar de que los diferentes tratamientos almacenados a esta temperatura sufrieron una intensa actividad proteolítica endógena, tampoco se observaron en nuestro caso incrementos en la solubilidad de las proteínas miofibrilares.

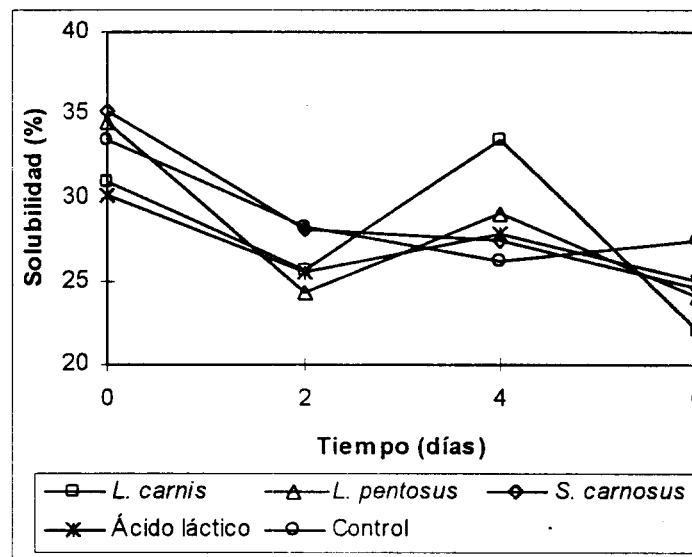


Figura 20: Solubilidad de las proteínas miofibrilares en carne almacenada a 20 °C

Cuando se someten las proteínas a la acción de ácidos, éstos ocasionan ionización de las proteínas y la consecuente repulsión electrostática intramolecular. El rechazo entre grupos vecinos cargados hace que el polímero se desdoble y pierda sus estructuras. Este proceso de desnaturalización por bajos valores de pH desdobra o distiende la cadena proteica, expone sus grupos hidrofóbicos internos y hace que la proteína adquiera una organización menos ordenada, dependiendo de la intensidad del tratamiento y de las fuerzas que estabilicen a la molécula. Como resultado, estas estructuras con conformación alterada son normalmente menos solubles que sus formas nativas (Badui, 1999). El pH cárnico sufrió una reducción importante en todos los tratamientos evaluados, alcanzando valores por debajo de 5.0, lo que junto con una mayor temperatura de almacenamiento pudo

ocasionar la reducción en la solubilidad proteica, al generar cierto grado de desnaturalización.

6.7 Determinación de grupos sulfhidrilos

La desnaturalización proteica en las carnes, ya sea por maduración o por procesamiento de las mismas, influye en el contenido de los grupos sulfhidrilos vinculados a las proteínas, por lo que también modifica la conformación molecular y la actividad superficial de las mismas (Ancín y col., 1989b; Damodaran, 1994).

La importancia de los grupos sulfhidrilos sobre las propiedades funcionales de las proteínas, se discutirá con mayor amplitud en la sección 6.9 (propiedades de emulsificación).

6.7.1 Carne almacenada a 4 °C

La concentración de grupos SH presentes en las proteínas miofibrilares no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos realizados y el control ($p > 0.864$) (figura 21). Similar fue el comportamiento evidenciado a lo largo del almacenamiento, observándose las concentraciones de grupos SH más bajas hacia el día 8 de almacenamiento en refrigeración ($p > 0.002$) (Anexo 1, tabla 23). Totosaus-Sánchez (1996) reporta un incremento progresivo en la concentración de grupos SH en la carne bovina almacenada a 4 °C, atribuyéndoselo a un proceso gradual de desnaturalización de la proteína cárnica. Por su parte, Chawla y col. (1996) describen una disminución en la concentración de grupos sulfhidrilos libres cuando la carne sufre un descenso en su pH al ser tratada con diferentes ácidos orgánicos (además de sufrir alteraciones estructurales en la molécula proteica). Una disminución similar en la concentración de grupos sulfhidrilos libres fue descrita por Ishioroshi y col. (1979) en carne almacenada bajo refrigeración durante 15 días, atribuyéndola a fenómenos de agregación entre las moléculas de miosina debidos a la oxidación de los grupos SH y a una posterior interacción intermolecular durante el almacenamiento.

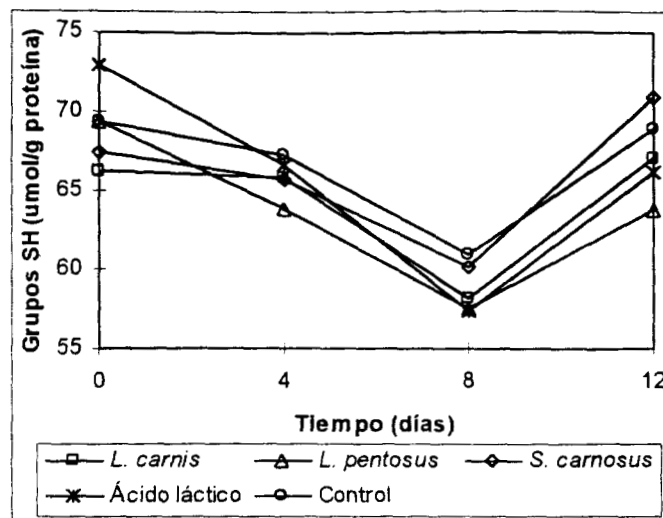


Figura 21: Concentración de grupos SH en proteínas miofibrilares de carne almacenada a 4 °C

6.7.2 Carne almacenada a 20 °C

Al igual que lo observado en el caso anterior no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.853$) en la concentración de grupos SH de las proteínas miofibrilares de carne sometida a los diferentes tratamientos y almacenada bajo condiciones de abuso térmico (Anexo 1, tabla 23). Todos los tratamientos presentaron el mismo comportamiento a lo largo del almacenamiento, mostrando las menores concentraciones de grupos SH hacia el segundo día ($p > 0.05$) (figura 22). Una disminución similar en los grupos sulfhidrilos libres fue reportada por Chawla y col. (1996) cuando el pH cárnico sufre una disminución por la acción de diferentes ácidos orgánicos.

Los grupos sulfhidrilos poseen una gran importancia en la estabilidad de la estructura terciaria de las proteínas musculares, como ya se mencionó anteriormente, haciendo que se plieguen hasta su conformación nativa y afectando por ende, la funcionalidad de estas macromoléculas. Los grupos disulfuro, por su parte, originan una reducción drástica en la flexibilidad de la proteína nativa, por lo que el entendimiento de la importancia de la relación entre los grupos SH y SS es fundamental para la interpretación y manipulación de las propiedades funcionales (German y Phillips, 1994).

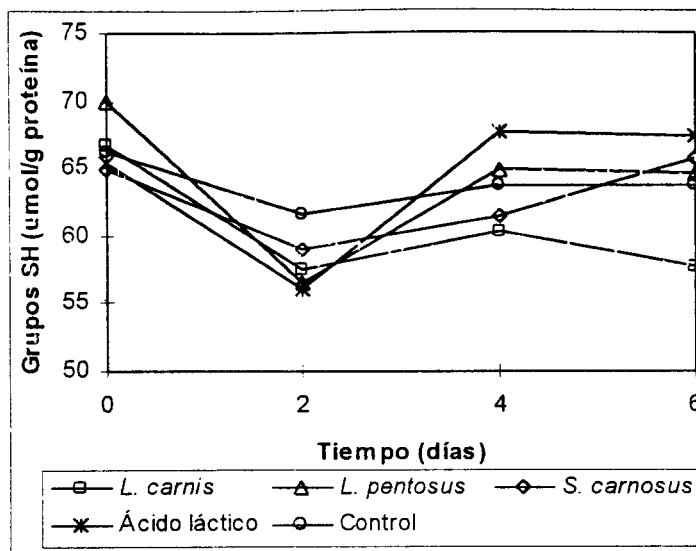


Figura 22: Concentración de grupos SH en proteínas miofibrilares de carne almacenada a 20 °C

6.8 Propiedades de gelificación

La gelificación de las proteínas musculares es la gran responsable de la estabilización química y física de la grasa y el agua en productos cárnicos y de la unión entre las piezas que lo conforman. La textura de varios productos cárnicos está en función de la capacidad de gelificación de las proteínas y de la interacción específica con la fase acuosa y grasa (Ziegler y Acton, 1984).

6.8.1 Carne almacenada a 4 °C

La fuerza para penetrar los geles obtenidos a partir de proteínas miofibrilares de carne tratada con ácido láctico es la menor requerida respecto de todos los demás tratamientos evaluados ($p > 0.001$). El resto de los tratamientos no mostró diferencias estadísticamente significativas con la muestra control ($p > 0.078$). La fuerza de penetración en todos los tratamientos sufre un descenso progresivo a lo largo del almacenamiento en refrigeración (figura 23), siendo las requeridas a los días 8 y 12 las menores ($p > 0.001$) (Anexo 1, tabla 24). La fuerza de penetración presenta una correlación estadísticamente significativa con el pH cárnico ($p > 0.001$) y con la solubilidad de las proteínas miofibrilares ($p > 0.002$) (Anexo 1, tabla 34). Una reducción similar en la rigidez de los geles de miosina.

en función del tiempo de almacenamiento bajo refrigeración, fue reportada por Ishioroshi y col. (1979).

La carne tratada con ácido láctico presentó la menor solubilidad de los extractos miofibrilares de todos los tratamientos evaluados, observándose modificaciones mínimas en este parámetro a lo largo del almacenamiento. Samejima y col. (1985) indican que la rigidez del gel es directamente proporcional a la solubilidad proteica. Sin embargo, otros autores han descrito que la solubilidad de las proteínas miofibrilares sometidas a un almacenamiento en refrigeración no parece estar relacionada con la rigidez de los geles (Lan y col., 1995b). En este mismo sentido, Liu y Xiong (1997) sugieren que la solubilidad, por sí sola, no puede explicar las propiedades de gelificación de las proteínas miofibrilares.

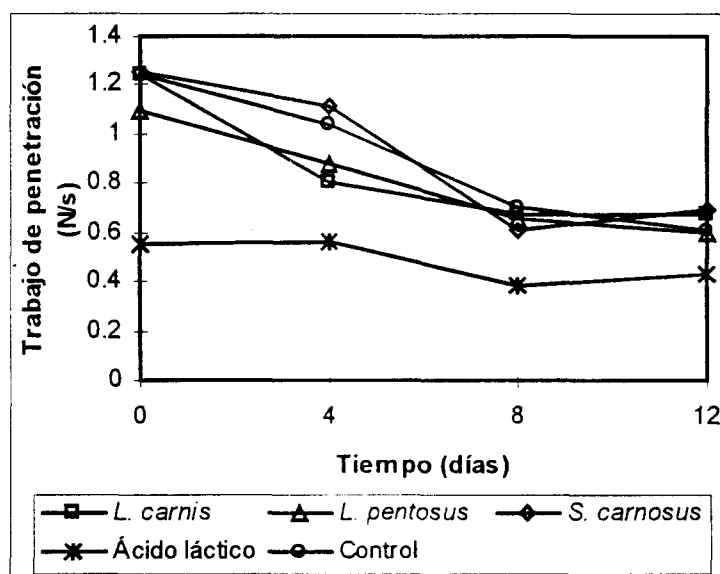


Figura 23: Penetración de geles de proteínas miofibrilares (4 °C)

Lan y col. (1995b y 1995c) reportaron que la fuerza de penetración de geles está profundamente influenciada por el pH, encontrando que el valor óptimo está entre 6.0 y 6.5, reduciéndose significativamente cuando el pH desciende por debajo de 5.5. Adicionalmente, describen que el músculo que presenta un pH postrigor de 7.0 (DFD) origina mayor rigidez de gel, a cualquier pH al que se lo ajuste posteriormente, que un músculo de pH normal (5.5). Esto sugeriría que el músculo con bajos valores iniciales de

pH genera mayor desnaturalización proteica, lo que reduciría su funcionalidad y sensibilidad al pH.

Una observación similar se realizó a partir de los datos obtenidos con las pruebas reológicas dinámicas. El módulo de almacenamiento (G') fue inferior en la carne tratada con ácido láctico ($p > 0.001$), no presentando los restantes tratamientos diferencias estadísticamente significativas respecto del control ($p > 0.222$). El módulo G' disminuyó progresivamente en función del tiempo de almacenamiento (figura 24), siendo los valores menores los registrados en los días 8 y 12 ($p > 0.001$) (Anexo 1, tabla 25). Se pudo observar una correlación estadísticamente significativa entre G' y el pH cárnico ($p > 0.001$), pero no así entre G' y la solubilidad de las proteínas miofibrilares ($p > 0.135$) (Anexo 1, tabla 34).

Vega-Warner y col. (1999) han descrito una compleja interacción entre el pH cárnico y las proteínas miofibrilares durante la gelificación inducida por calor y sugieren el efecto del pH final de la carne sobre las propiedades de gelificación de las moléculas proteicas. Una conclusión similar es aportada por Xiong y Blanchard (1994), al remarcar la importancia del pH cárnico sobre las propiedades de gelificación de las proteínas.

Bertazzon y Tsong (1990) reportaron una desestabilización de los diferentes dominios estructurales de la miosina al reducirse el pH cárnico. Cada dominio muestra cambios en su temperatura y entalpía de desnaturalización. Estos cambios fueron interpretados en términos de profundas modificaciones en grupos de residuos o alteraciones en el tamaño de estos dominios estructurales. Observaciones similares fueron descritas por Findlay y Stanley (1984), observando reducciones en el calor de transición, además de modificaciones en la temperatura de desnaturalización de las diferentes transiciones térmicas, por efecto del tiempo de almacenamiento y el pH cárnico. En el mismo sentido se han reportado modificaciones en las transiciones térmicas de los diferentes dominios estructurales de la miosina y de la entalpía de desnaturalización al disminuir el pH cárnico (Xiong, 1992). Vega-Warner y Smith (2001) reportan también una disminución en las temperaturas de transición de los primeros cuatro dominios estructurales de la miosina y un incremento en los cinco dominios finales, como consecuencia del descenso del pH cárnico.

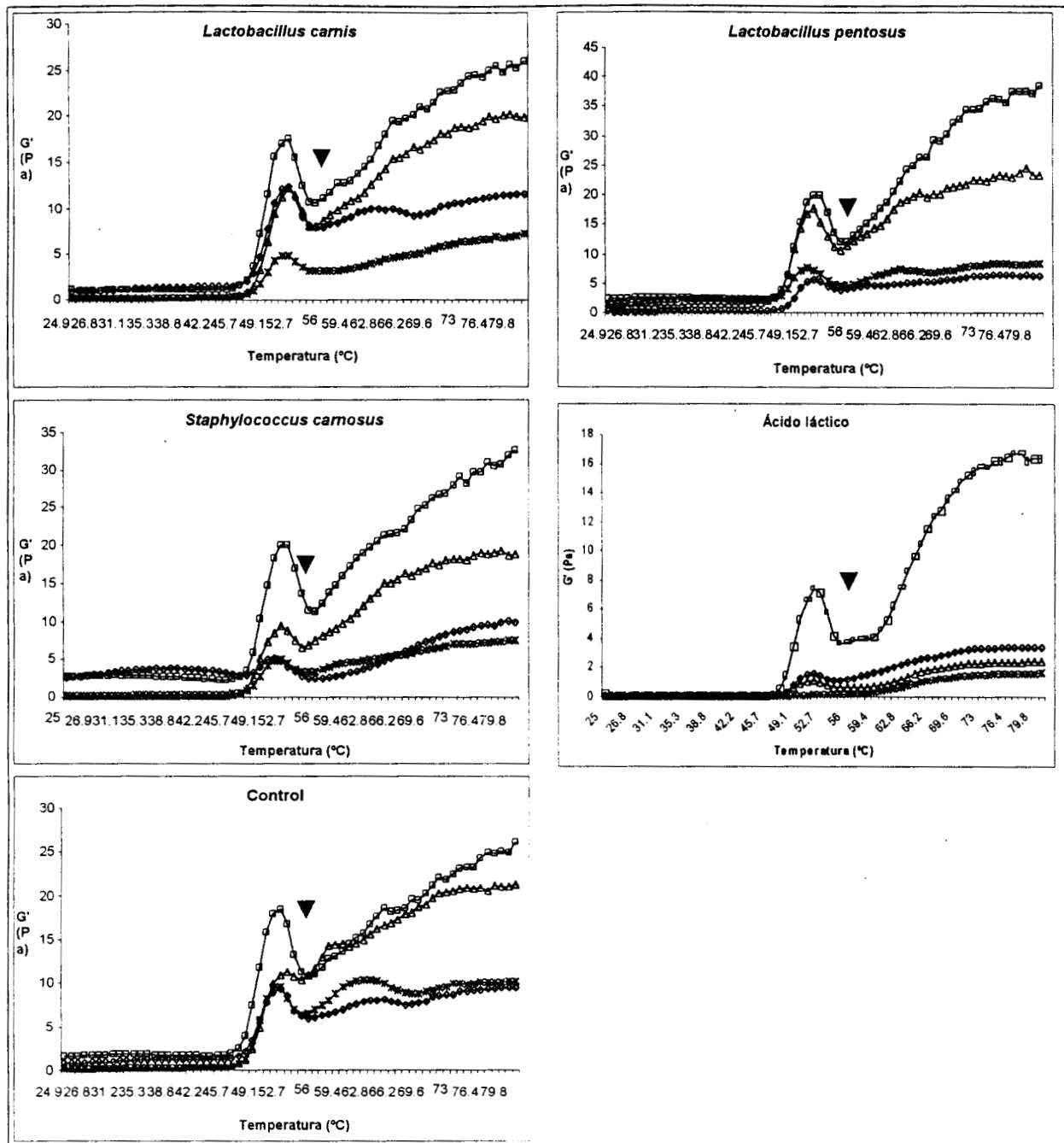


Figura 24: Módulo de almacenamiento (G') de carne almacenada a 4 °C
 Referencias: □, día 0; Δ, día 4; ◇, día 8; *, día 12; flecha, debilitamiento temporal de G' .

La estructura intacta de la miosina permite que cada dominio estructural se desnaturalice paso a paso y refleje la naturaleza cooperativa de la transición desde su conformación nativa hasta un estado menos estructurado durante la gelificación inducida

por calor (Visessanguan y An, 2000). Sobre la base de estos antecedentes se puede suponer que el pH cárnico generó cambios en las proteínas miofibrilares que alteraron sus propiedades de desnaturalización, así como modificaciones en la interacción proteína-proteína durante la agregación (por ejemplo temperatura y tasa de desnaturalización), cambios que repercutieron sobre los parámetros reológicos. Es importante remarcar que las modificaciones en las propiedades de gelificación de las proteínas miofibrilares no pueden ser explicadas totalmente por un proceso de proteólisis, ya que la carne almacenada en refrigeración sufrió una leve acción proteolítica solo alrededor del día 12.

Al comparar los datos obtenidos en los estudios de penetración y reológicos dinámicos se evidenció una correlación significativa ($p > 0.001$) entre ambos parámetros (Anexo 1, tabla 34). Los datos de rigidez de gel no están necesariamente en concordancia con el valor final de G' de los estudios reológicos dinámicos, ya que estas últimas son mediciones no destructivas mientras que la prueba de penetración sí lo es. Xiong y Blanchard (1994) han publicado que tanto los parámetros reológicos dinámicos como los estáticos, utilizados para evaluar las propiedades de los geles de proteínas miofibrilares, están afectados por similares factores, tanto intrínsecos como extrínsecos, pudiendo ser comparables. Sin embargo, los dos tipos de parámetros representan diferentes aspectos del perfil reológico de los geles proteicos y por lo tanto no están relacionados de un modo simple (Liu y Xiong, 1997).

Después de la primera elevación de los valores de G' , se observó una disminución en los valores de este parámetro (en el intervalo de temperatura de 55-60 °C) (flecha en figura 24), incrementándose posteriormente en forma progresiva hasta el final de la gelificación (80°C). Se han postulado al menos cuatro hipótesis para explicar dicho fenómeno: la primera propone que las interacciones generadas a temperaturas cercanas a los 50 °C son esencialmente termolábiles y se rompen al incrementarse la temperatura, para finalmente ir aumentando la rigidez del gel al desarrollarse interacciones termoestables entre las proteínas participantes en el mismo (Boyer y col., 1996). La segunda implica la participación de enzimas proteolíticas endógenas, que son activadas a temperaturas cercanas a los 50 °C y que generan la hidrólisis de las proteínas que comienzan a formar el

gel (Hamann y col., 1990; Wang y Xiong, 1998). Smyth y col. (1996) sugieren que este debilitamiento en el gel está relacionado con la desnaturalización de las cadenas ligeras de la miosina. Por último, Sano y col. (1989) y Visessanguan y col. (2000), proponen que la disminución temporal en el módulo de almacenamiento es causada por una ruptura de la matriz del gel, generada en parte por la disociación de la molécula de miosina del filamento de actina y en parte por la fragmentación del filamento de actina. En nuestro caso, se ha observado que la disminución transitoria en el intervalo de temperatura de 55-60°C para el módulo de almacenamiento se reducía de forma considerable a medida que avanzaba el periodo de almacenamiento de las muestras. El complejo actomiosina es muy estable en torno a un valor de pH de 6.0, disminuyendo cuando el pH se ve reducido (Xiong, 1992). Es probable que con el avance del almacenamiento (Hultin, 1993) y con los bajos pH generados en la carne (Ito y col., 1978; Wu y Smith, 1987), el complejo actomiosina se haya relajado y, en concordancia con la hipótesis formulada por Sano y col. (1989) y Visessanguan y col. (2000), se reduzca el debilitamiento temporal de los geles.

No se observaron diferencias significativas en el valor de $\tan \delta$ entre los diferentes tratamientos evaluados y el control ($p > 0.848$) ni entre los diferentes tiempos de almacenamiento ($p > 0.389$) (Anexo 1, tabla 26), lo que indica que los tratamientos influyen sobre la rigidez de los geles pero no sobre su elasticidad.

Los geles de proteínas miofibrilares formados a partir de carne al inicio del almacenamiento mostraron al microscopio electrónico de barrido una estructura globular compacta y homogénea, evidenciando corpúsculos esféricos, típicos de un gel con alta rigidez (figura 25). Esta morfología de gel se presenta cuando se utilizan proteínas miofibrilares, a diferencia de la estructura fina de redes tridimensionales que aparece cuando se emplea solamente miosina (Smith y Brekke, 1985; Boyer y col., 1996; Lefèvre y col., 1998). La estructura de los geles obtenidos a partir de proteínas miofibrilares de carne tratada con ácido láctico fue más abierta, en comparación con la formación más compacta de los geles obtenidos a partir de los tratamientos control e inoculado con bacterias bioprotectoras. Esto coincidió con los datos obtenidos en la prueba de penetración de geles y en las pruebas reológicas dinámicas, donde los geles procedentes del tratamiento con

ácido láctico mostraron los menores valores de trabajo de penetración y módulo de almacenamiento, respectivamente.

Hacia el final del almacenamiento se pudo observar una mayor laxitud en los geles obtenidos de la carne control y la inoculada con bacterias bioprotectoras, con respecto al día 0 de almacenamiento, lo que explicaría el descenso en la fuerza de penetración de geles y G' reportados por las pruebas reológicas estáticas y dinámicas, respectivamente. Los geles obtenidos de carne tratada con ácido láctico mostraron una mayor apertura y ruptura de la microestructura (figura 25).

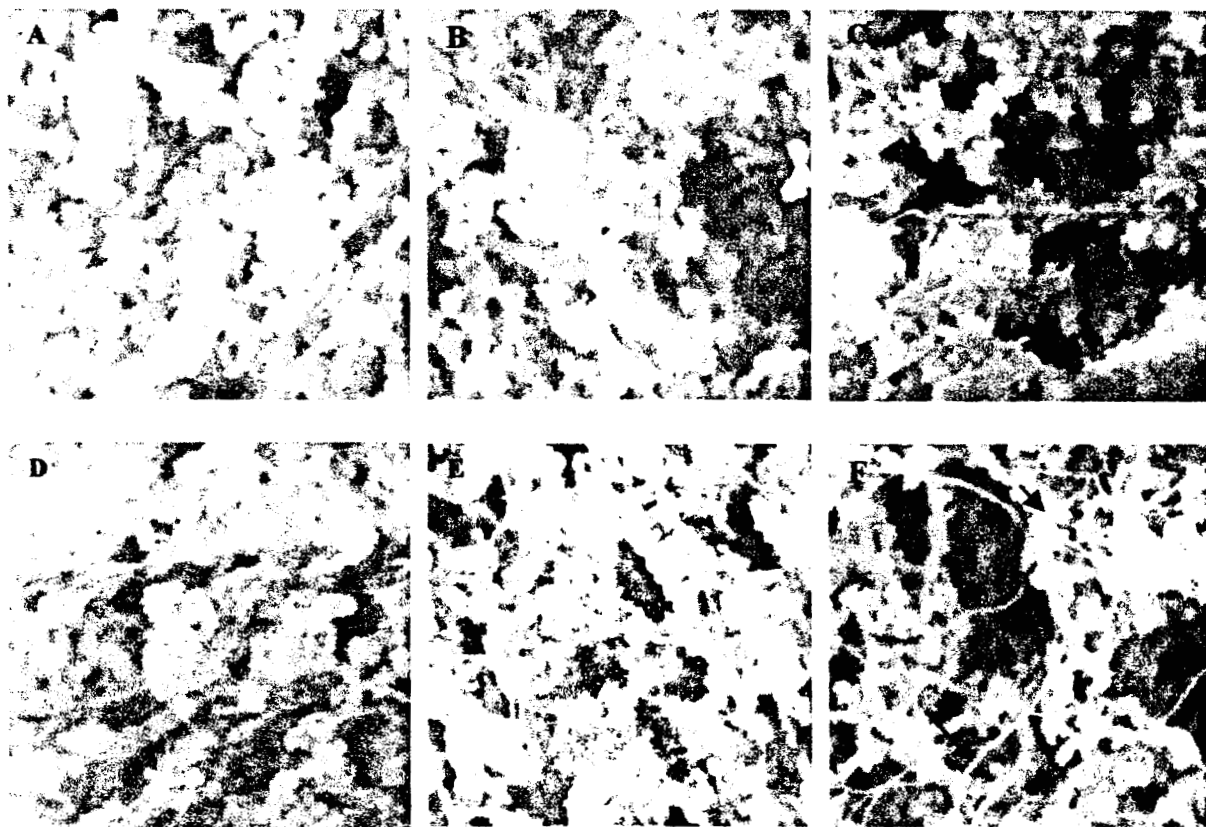


Figura 25: Microscopía electrónica de barrido de geles de proteínas miofibrilares. Referencias: A y D) control; B y E) inoculada con bacterias bioprotectoras; C y F) tratada con ácido láctico; A, B y C) día 0 de almacenamiento; D, E y F) día 12 de almacenamiento (Amplificación: 15000x).

Barbut (1994) y Tazawa y col. (2002) han descrito la secuencia de agregación de la molécula de miosina sometida a tratamientos térmicos en diferentes especies animales,

coincidiendo en que la misma acontece mediante un proceso de asociación intermolecular en una región cercana a las cabezas globulares (subunidad 2) para formar, a temperaturas bajas, dímeros de miosina. A medida que la temperatura se eleva, se forman trímeros y luego oligómeros para formar una masa globular de aproximadamente 60 nm, con las colas de la miosina dispuestas en forma radial. Incrementando la temperatura, los oligómeros coalescen para formar partículas y agregados de aproximadamente 100-200 nm, contribuyendo las colas a formar la red tridimensional de los geles de miosina inducidos por calor.

Visessanguan y An (2000) reportaron que la integridad molecular facilita el desplegamiento de cada dominio estructural de la miosina, siendo éste la base para una agregación correcta y ordenada de las cadenas proteicas en la formación de un gel elástico. La desnaturalización de la miosina genera que algunos segmentos de la molécula se encuentren disponibles para la agregación, depositándose en pequeños fragmentos y provocando de esta forma la ruptura en la ultraestructura del gel resultante.

Los filamentos que se presentan en los geles obtenidos a partir de la carne tratada con ácido láctico hacia el final del almacenamiento (flechas en la figura 25 F), se asemejan a los observados en los geles generados de forma espontánea al disminuir el pH de las proteínas miofibrilares a 4, formados por un incremento en la asociación proteína-proteína (Barbut, 1994).

6.8.2 Carne almacenada a 20 °C

La fuerza requerida para penetrar los geles obtenidos a partir de proteínas miofibrilares de carne tratada con ácido láctico es estadísticamente inferior a la exigida para geles elaborados con proteínas procedentes de carne sometida a cualquiera de los otros tratamientos ($p > 0.001$) (Anexo 1, tabla 24). Al inicio del experimento se presentó la mayor fuerza de penetración ($p > 0.001$), disminuyendo en un alto grado hacia el segundo día de almacenamiento y permaneciendo con escasos cambios hasta la finalización del mismo ($p > 0.051$) (figura 26).

El trabajo de penetración muestra correlación significativa con la concentración de miosina ($p>0.001$), la concentración de actina ($p>0.002$), el pH cárnico ($p>0.001$) y la solubilidad de las proteínas miofibrilares ($p>0.001$) (Anexo 1, tabla 34).

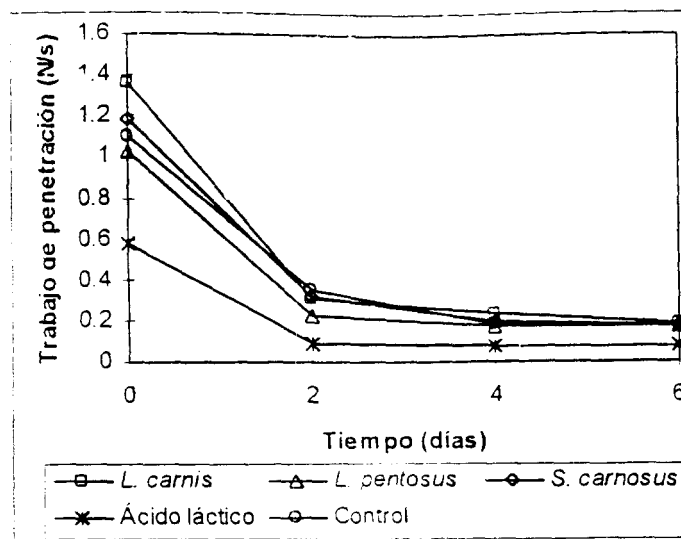


Figura 26: Penetración de geles de proteínas miofibrilares (20 °C)

En coincidencia con los resultados del estudio de penetración, el módulo de almacenamiento fue también inferior para los geles generados a partir de carne tratada con ácido láctico ($p>0.002$). Los restantes tratamientos no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al control ($p=0.109$) (Anexo 1, tabla 25). Al inicio del almacenamiento se presentó el mayor valor de G' ($p>0.001$), disminuyendo progresivamente a lo largo del estudio (figura 27). Al comparar los datos obtenidos a partir de las determinaciones reológicas dinámicas (G') y de penetración de geles se observa una correlación significativa entre ambos parámetros ($p>0.001$) (Anexo 1, tabla 34), concordando con lo descrito por Xiong y Blanchard (1994) en cuanto a la interrelación de los resultados obtenidos a partir de estudios reológicos dinámicos y estáticos.

En los geles de proteínas miofibrilares obtenidos a partir de carne tratada con ácido láctico no es posible observar la primera transición de temperatura a partir del segundo día de almacenamiento. Desde el día 4 sólo se presenta una ligera elevación en el módulo de almacenamiento en función del calentamiento (figura 27)

La elasticidad de los geles obtenidos a partir de carne tratada con ácido láctico fue inferior al resto ($p > 0.001$), al evaluar los valores de $\tan \delta$ (Anexo 1, tabla 26). La elasticidad presentada por los geles obtenidos a partir de carne en el último día de almacenamiento fue inferior a la observada en los restantes días de la incubación. Estos datos concuerdan con los reportados por Visessanguan y An (2000), quienes describen una reducción en la elasticidad de los geles de proteínas debida a la hidrólisis sufrida por las principales proteínas miofibrilares.

El módulo de almacenamiento presenta una correlación significativa con la concentración de miosina ($p > 0.001$), el pH cárnico ($p > 0.002$) y la solubilidad de las proteínas miofibrilares ($p > 0.002$); pero no con la concentración de actina ($p > 0.230$) (Anexo 1, tabla 34). La elasticidad de los geles presentó correlación significativa con la concentración de miosina en el extracto proteico ($p > 0.001$), estando relacionados en forma inversamente proporcional (Anexo 1, tabla 34).

La hidrólisis de las proteínas miofibrilares generó una severa reducción tanto en el desarrollo del módulo de almacenamiento como en su valor final. Se ha descrito que estos parámetros disminuyen según el grado de proteólisis sufrida (Visessanguan y An, 2000). Coincidiendo con lo observado en el presente trabajo, estos autores concluyeron que la degradación de la miosina (particularmente de la cadena pesada) es el principal factor que contribuye a la disminución de los parámetros reológicos del gel. Los mismos autores han sugerido que la miosina hidrolizada presenta una tendencia a desnaturalizarse con mayor facilidad que la miosina nativa, debido a la menor entalpía requerida para generar su desnaturalización térmica. Asimismo, reportaron una disminución en el contenido de α -helice de la proteína. Smith y Brekke (1985) reportan un descenso importante en la calidad, rigidez, elasticidad y capacidad de ligar agua de geles de proteínas miofibrilares sometidas a la acción de enzimas proteolíticas.

En cuanto a la correlación entre la solubilidad de las proteínas miofibrilares y la rigidez de los geles, en función del tiempo de almacenamiento, resultados similares han sido reportados por Ishioroshi y col. (1979). Para formar un gel elástico, las proteínas

miofibrilares deben ser, previamente solubilizadas, por lo que cualquier cambio en la solubilidad proteica provocará una alteración en sus propiedades de gelificación.

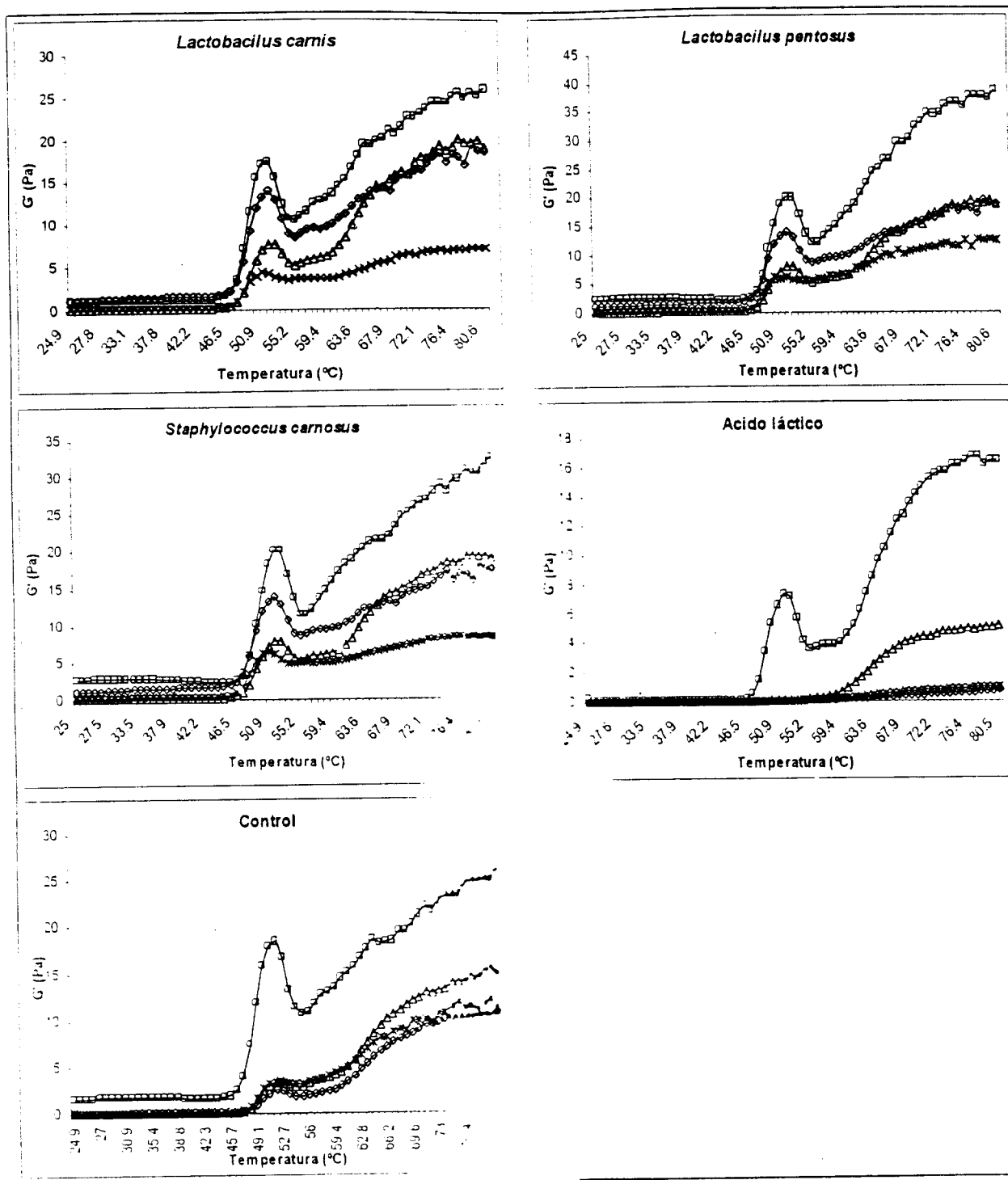


Figura 27: Módulo de almacenamiento (G') de carne almacenada a 20 °C
 Referencias: □, día 0; Δ, día 2; ◇, día 4; *, día 6.

Findlay y Stanley (1984) reportaron importantes disminuciones en la entalpía de desnaturalización de los diferentes dominios estructurales de la miosina cuando la carne fue almacenada durante 8 días a 20 °C. Esta reducción fue asociada con la proteólisis sufrida por las moléculas proteicas.

La carne almacenada bajo abuso térmico evidencia una importante proteólisis de la cadena pesada de la miosina, pudiendo ser éste el factor principal que condicionó la capacidad de gelificación de las proteínas miofibrilares. Resultados similares fueron reportados por Ishioroshi y col. (1979), observándose una relación lineal entre la rigidez de los geles y la concentración de la miosina.

Para la molécula de miosina intacta, cada pico endotérmico se deriva de cada uno de los dominios estructurales, los cuales se despliegan a diferentes temperaturas en función de su estabilidad térmica. La hidrólisis de la molécula origina la reducción de su tamaño y la destrucción de su complejidad estructural, lo que a su vez ocasiona la reducción en la entalpía requerida para su desnaturalización (Visessanguan y An, 2000). La desnaturalización y agregación térmica son procesos continuos y cooperativos, por lo que cambios en las propiedades de desnaturalización proteica afectan la subsiguiente agregación. Todos estos datos coinciden en apuntar a que la proteólisis afectó la gelificación por calor de la miosina, al modificar sus propiedades de desnaturalización y agregación.

No se realizaron análisis mediante microscopía electrónica de barrido para geles obtenidos a partir de carne almacenada a 20 °C, en ninguno de los tratamientos, debido a que éstos eran muy débiles e incapaces de soportar las etapas iniciales de fijación, deshaciéndose su estructura a partir del segundo día de almacenamiento.

6.9 Propiedades de emulsificación

Son muchos los derivados cárnicos en los que la formación de un sistema emulsion es uno de los factores responsables de la textura y contribuye de modo relevante a la calidad organoléptica del producto terminado (Araim y col., 1989b).

6.9.1 Carne almacenada a 4 °C

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el índice de actividad de emulsión (IAE) de los diferentes tratamientos evaluados y el de la muestra control ($p > 0.897$).

El comportamiento del IAE en función del tiempo de almacenamiento en refrigeración sí muestra un efecto estadísticamente significativo ($p > 0.001$) (Anexo 1, tabla 27), alcanzando su valor mínimo hacia el octavo día y siendo máximo en el último día de almacenamiento (figura 28a). Totosaus y col. (1998) reportaron una disminución similar en el IAE en la primera semana de almacenamiento de carne bovina bajo condiciones de refrigeración, incrementándose y alcanzando los mayores niveles hacia la segunda semana.

Este patrón de comportamiento fue constante en todos los tratamientos evaluados, observándose una correlación significativa (0.001) entre el IAE y la concentración de grupos SH en las proteínas miofibrilares (Anexo 1, tabla 35). El valor más bajo del IAE se presentó cuando la concentración de grupos SH fue mínima también. Una correlación similar fue reportada por Ancín y col. (1989a), pero en éste caso se encontró que a medida que disminuían los grupos sulfhidrilos libres se estabiliza mayor cantidad de superficie en la interfase. Li-Chan y col. (1985) han descrito también, en concordancia con los resultados del presente trabajo, que la concentración de grupos SH libres está positivamente correlacionada con las propiedades de emulsión. De acuerdo con su estabilidad estructural, las proteínas tienden a desplegarse estructuralmente y a orientarse en la interfase agua:aceite. Por ello, la actividad en interfase de la proteína es fiel reflejo de sus características conformacionales y afecta a la capacidad de esa proteína para participar con más o menos eficiencia en un sistema tipo emulsión (Nakai, 1983; Ancín y col., 1989b). La función fundamental de los puentes disulfuro es estabilizar la estructura tridimensional, al hacer que la proteína se pliegue en su conformación nativa. Un incremento en el contenido de grupos SH libres (aparentemente por desnaturalización), provocaría un desplegamiento de la molécula proteica, generándose una mayor flexibilidad. En una emulsión, dicho desplegamiento y flexibilidad proteicos se combinarían para extender, reorientar, ampliar y formar una película cohesiva continua en la interfase aceite:agua, orientando los dominios

hidrofóbicos hacia la fase apolar (Das y Kinsella, 1990). En nuestro caso, al detectarse menor cantidad de grupos SH libres, probablemente la molécula se presentó más rígida, pudiendo ésto explicar el bajo IAE evidenciado hacia el día 8 de almacenamiento. German y Phillips (1994) han descrito que la principal función de los puentes disulfuro en una emulsión es estabilizar la molécula proteica, restringir su desplegamiento e impedir la completa exposición de las regiones hidrofóbicas.

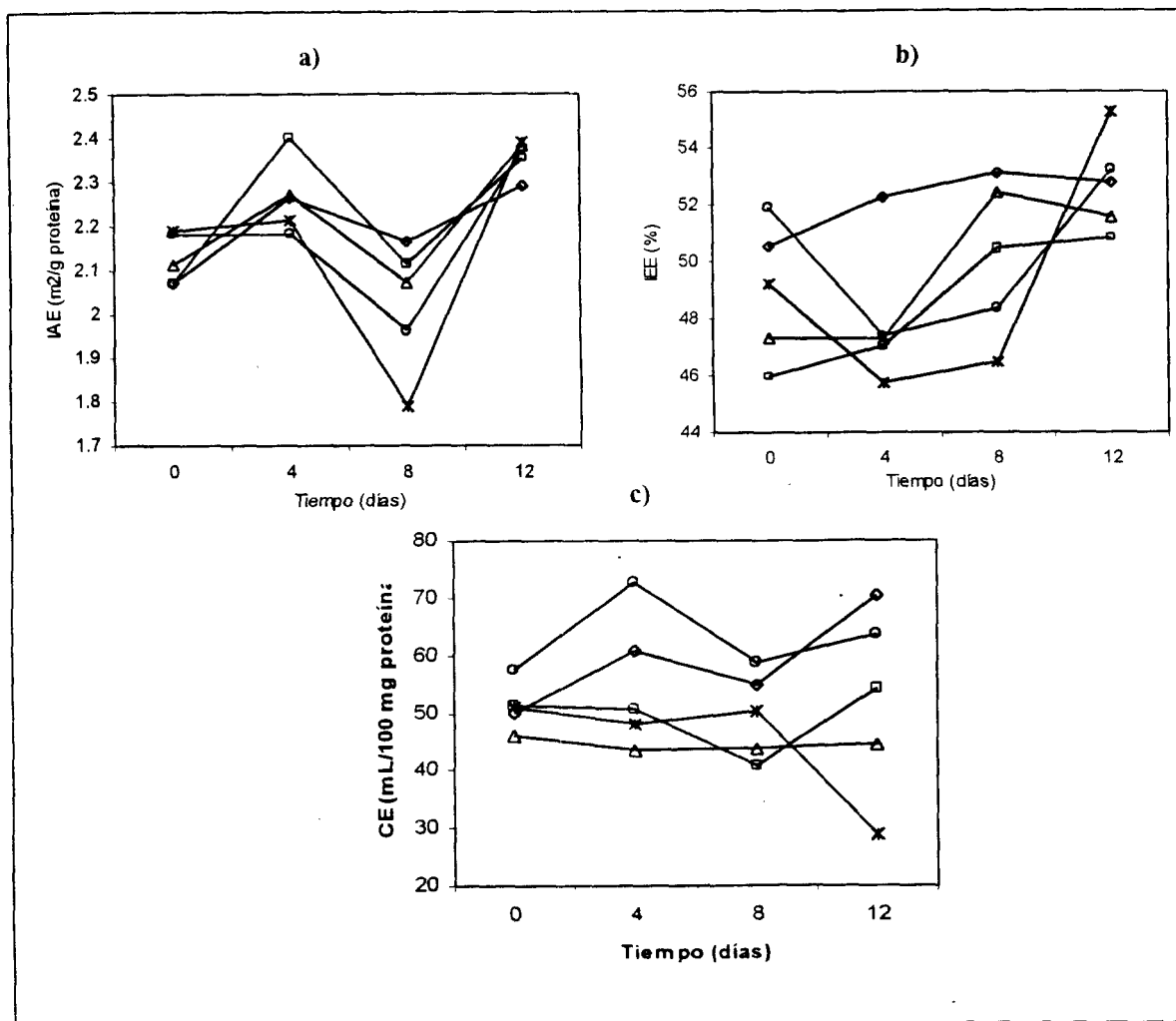


Figura 28: Parámetros de emulsión (IAE, IEE y CE) de carne almacenada a 4°C. Referencias : □, *L. carnis*; Δ, *L. pentosus*; ◇, *S. carnosus*; *, ácido láctico; O, control.

Como ya se expuso en la sección 6.5.1 (Actividad proteolítica), el último día de almacenamiento presentó una leve pero significativa reducción en la concentración de miosina, posiblemente como resultado de la actividad proteolítica endógena. Es en este día en el que se observó el mayor IAE en todos los tratamientos evaluados. De acuerdo con

algunos autores (Smith y Brekke, 1984 y 1985; Li-Chan y col., 1985; Sheen y Sheen, 1988; Chobert y col., 1988; Das y Kinsella, 1990; Kristinsson y Rasco, 2000), la hidrólisis controlada de las proteínas incrementa su capacidad emulsionante. La hidrólisis proteica incrementa el número de grupos cargados, debido a los grupos amino y carboxilo generados y conlleva a una disminución en el peso molecular, un incremento de la hidrofilia y un cambio en la configuración molecular. Smith y Brekke (1985) reportan incrementos en las propiedades emulsionantes de las proteínas hidrolizadas aún cuando la solubilidad original de éstas sea reducida y el proceso se de a pHs bajos (4.5-5.0) condiciones similares a las observadas en el presente trabajo. La proteólisis genera mayor flexibilidad molecular, un desplazamiento de los grupos hidrofóbicos hacia la superficie y una disminución en el tamaño de las moléculas y por ende una migración más fácil hacia la interfase aceite:agua. Todos estos cambios influyen en gran medida sobre la solubilidad de las proteínas modificadas y en consecuencia provocan cambios en sus propiedades emulsionantes (Sheen y Sheen, 1988; Chobert y col., 1988; Das y Kinsella, 1990).

La capacidad de emulsión (CE) por su parte, mostró un efecto estadísticamente significativo en función del tratamiento aplicado ($p > 0.001$), siendo mínima para la carne tratada con ácido láctico, *L. carnis* o *L. pentosus*. No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en los distintos tiempos de almacenamiento en refrigeración ($p > 0.665$) (Anexo 1, tabla 29), aunque puede observarse que los menores valores se presentaron (al igual que ocurrió en el caso del IAE) hacia el día 8. Los valores de CE no presentan una correlación estadísticamente significativa con la concentración de grupos SH libres ($p > 0.141$) (Anexo 1, tabla 35) (figura 23c). Tampoco se observó correlación entre la capacidad de emulsión de las proteínas y el pH cárnico, aunque los tratamientos que generaron menor CE fueron aquellos que mostraron los menores niveles de pH a lo largo del almacenamiento. Galluzzo y Regenstein (1973) reportaron una disminución en la CE a medida que el pH se aproxima al pI de la miosina, atribuyendo dicho efecto a la pérdida de carga neta en la proteína y a la reducción de la solubilidad. En el presente trabajo no se apreció una correlación entre la CE y la solubilidad proteica, requiriéndose información adicional (por ejemplo, hidrofobicidad y grado de desnaturalización proteica) para explicar completamente el fenómeno observado. Otros autores (Nakai, 1983; Voutsinas y col., 1983).

Li-Chan y col., 1984 y 1985) consideran que la CE de una proteína no puede ser entendida solamente de acuerdo a su solubilidad sino como el resultado de una compleja interacción de factores, entre los que destacan la hidrofobicidad superficial y la presencia de grupos SH libres.

El índice de estabilidad de emulsión (IEE) no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ensayados y el control ($p > 0.550$), coincidiendo con lo observado para el IAE. En el cuarto día de almacenamiento en refrigeración se presentó menor estabilidad de la emulsión, aunque los valores solo fueron estadísticamente significativos ($p > 0.05$) respecto de los obtenidos para el día 12 (Anexo 1, tabla 28). Es probable que la hidrólisis, mínima pero significativa, sufrida por la molécula de miosina haya generado cambios estructurales suficientes para impartir mejores cualidades en la formación de las emulsiones y en su estabilidad, en concordancia con lo reportado por Kristinsson y Rasco (2000) (figura 28b).

6.9.2 Carne almacenada a 20 °C

El tratamiento control presentó el mayor IAE, pero sólo hubo diferencias estadísticamente significativas en comparación con la carne inoculada con *L. carnis* ($p > 0.05$) (figura 29a).

El menor IAE de las proteínas miofibrilares se evidenció hacia el segundo día de almacenamiento bajo condiciones de abuso térmico (Anexo 1, tabla 27). De la misma forma que en el caso de la carne almacenada bajo refrigeración, el descenso en el IAE se presenta cuando la concentración de grupos SH es también mínima, existiendo una correlación significativa ($p > 0.001$) entre ambos parámetros (Anexo 1, tabla 35). Las proteínas que presentan un número importante de enlaces disulfuro y una gran interacción entre sus diferentes segmentos limitan la flexibilidad de la molécula y la exposición de los segmentos hidrofóbicos hacia a la fase lipídica de las emulsiones (Damodaran, 1994; Hill, 1996). Esto explicaría los bajos valores de IAE cuando las proteínas sufren la reducción en la concentración de grupos sulfhidrilos libres hacia el segundo día de almacenamiento.

El IAE se correlaciona de forma positiva con el pH cárnico ($p > 0.001$), aunque no con la solubilidad de las proteínas miofibrilares ($p > 0.652$) (Anexo 1, tabla 35). Flores y Bermell (1985) han descrito que la capacidad de las proteínas miofibrilares para actuar como agentes emulsionantes disminuye conforme el pH se aproxima a su pI. En este trabajo, no obstante, la solubilidad de las proteínas no fue el factor más importante en controlar la actividad emulsionante. Resultados similares han sido reportados por Gaska y Regenstein (1982), quienes no coinciden con el punto de vista tradicional de que una alta solubilidad proteica es el factor más importante para predecir su actividad emulsionante.

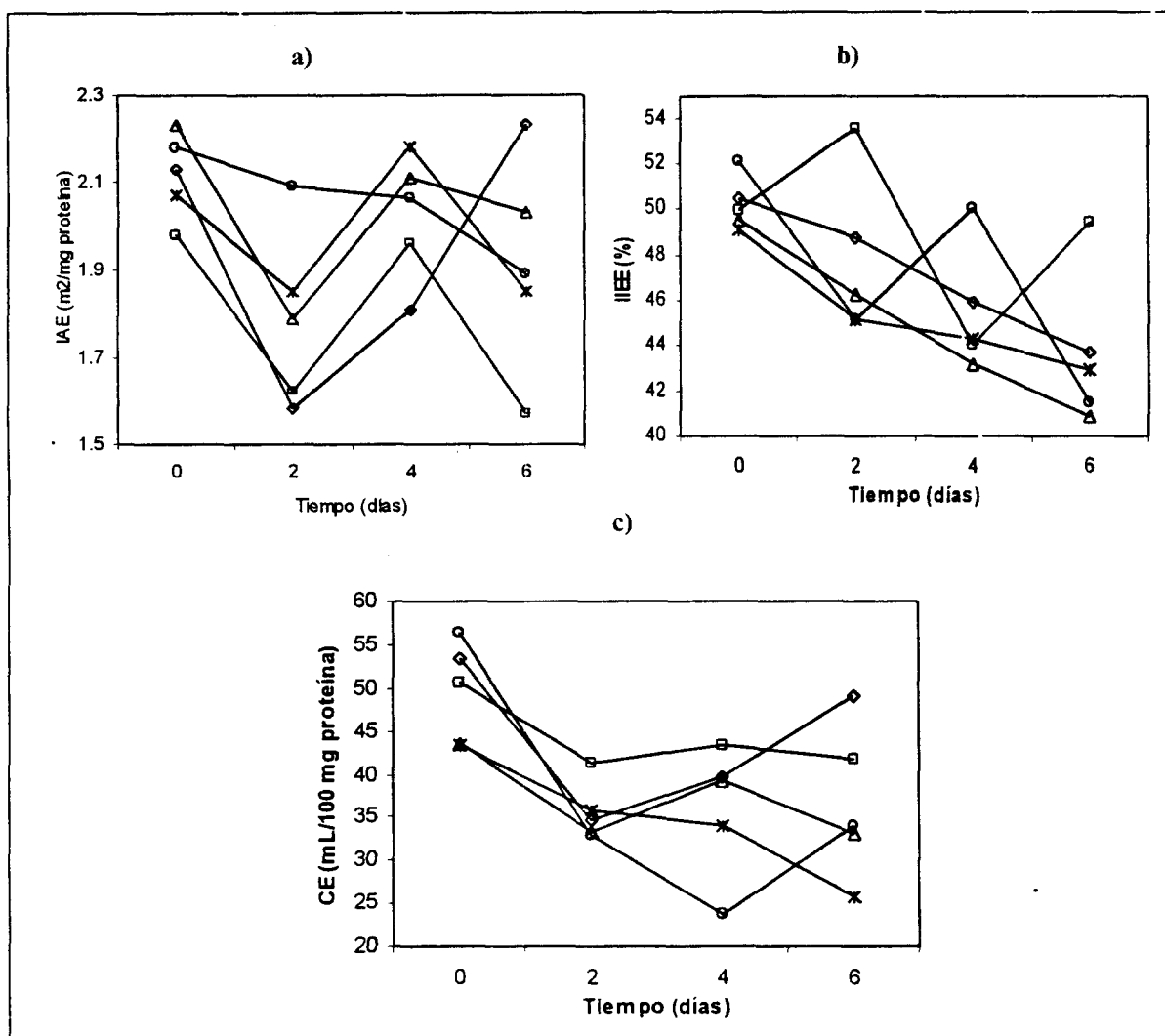


Figura 29: Parámetros de emulsión (IAE, IEE, CE) de carne almacenada a 20 °C
 Referencias : □, *L. carnis*; Δ, *L. pentosus*; ◇, *S. carnosus*; *, ácido láctico; ○, control.

La carne tratada con ácido láctico mostró la menor capacidad de emulsión, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas respecto al control ($p > 0.059$). La

CE presentó una importante caída desde el inicio del almacenamiento, siendo su valor máximo el día 0 ($p > 0.001$) (Anexo 1, tabla 29). Este parámetro mostró estar correlacionado significativamente tanto con la solubilidad de las proteínas miofibrilares ($p > 0.001$) como con la concentración de grupos SH presentes en ellas ($p > 0.001$) (Anexo 1, tabla 35) (figura 29c). La carne almacenada bajo condiciones de abuso térmico registró una importante hidrólisis de las principales proteínas miofibrilares, desde el inicio del almacenamiento. Si bien se ha reportado que la proteólisis proporciona mejores propiedades emulsionantes a las proteínas, el control del grado de hidrólisis sufrido es sumamente importante en la determinación de las propiedades de la proteína modificada (Quaglia y Orban, 1990). Un número importante de estudios reportan que la hidrólisis proteica como medio para incrementar la actividad de emulsión, resulta ineficaz o incluso perjudicial si el proceso no es controlado (Chobert y col., 1988; Sheen y Sheen, 1988; Das y Kinsella, 1990; Quaglia y Orban, 1990). Existe una relación positiva entre la actividad emulsionante y la longitud de la cadena proteica, siendo ampliamente aceptado que los péptidos deben contener al menos 20 residuos aminoacídicos para poseer buenas propiedades emulsionantes. Algunos estudios indican que los péptidos de bajo peso molecular poseen una reducida actividad emulsionante, como resultado de la disminución en la hidrofobicidad superficial (Quaglia y Orban, 1990; Mahmoud y col., 1992). Los pequeños péptidos difunden rápidamente, se absorben en la interfase y son menos eficientes a la hora de reducir la tensión superficial, debido a que no pueden desdoblarse y reorientarse en la interfase como lo hacen las proteínas o hidrolizados de mayor peso molecular (Kristinsson y Rasco, 2000). Además de estas razones, la solubilidad de las proteínas miofibrilares disminuye paulatinamente a lo largo del almacenamiento contribuyendo a disminuir aún más su capacidad de emulsión.

No se observó efecto del tratamiento sobre los valores de IEE en la carne almacenada simulando abuso térmico ($p > 0.508$). Este parámetro mostró una caída gradual a lo largo del almacenamiento, resultando estadísticamente diferente la estabilidad registrada en el inicio y en el último día de almacenamiento ($p > 0.037$) (Anexo 1, tabla 28) (figura 29b). La disminución gradual en la solubilidad de las proteínas miofibrilares puede haber sido uno de los factores que haya influido en la caída de la estabilidad de la emulsión, estando dichos valores correlacionados desde el punto de vista estadístico ($p > 0.009$)

(Anexo 1, tabla 35). La solubilidad de un emulsionante es un parámetro crucial en el control de la coalescencia, siendo mínimo cuando la solubilidad se reduce y la carga neta de la proteína es baja (Das y Kinsella, 1990). Los mismos autores han reportado que los péptidos resultantes de la hidrólisis proteica reducen la estabilidad de las emulsiones que forman. Esto es debido a que el diámetro promedio de los glóbulos grasos generados son superiores en presencia de péptidos que cuando son las proteínas originales quienes los conforman. El incremento en el diámetro de los glóbulos grasos ocasiona un aumento en la tasa de coalescencia y la ruptura de la película que rodea a los grandes glóbulos, colisionando entre sí, además de incrementar la tasa de cremado y, por ende, disminuir la estabilidad de las emulsiones (Das y Kinsella, 1990; Kristinsson y Rasco, 2000).

6.10 Determinación de color

La característica más importante por la cual se juzga la calidad de un alimento es su apariencia y el más importante de la apariencia es el color. Este atributo se asocia al alimento así como a los tratamientos tecnológicos o procesos degradativos que sufren los mismos (Pérez-Álvarez y col., 1998).

6.10.1 Carne almacenada a 4 °C

La luminosidad (L^*) observada en la carne tratada con ácido láctico fue significativamente superior ($p > 0.007$) al resto de los tratamientos evaluados (Anexo 1, tabla 30). Este parámetro presentó una correlación significativa ($p > 0.001$) con el pH cárnico (Anexo 1, tabla 36). Cuando el pH de la carne desciende desde su nivel fisiológico (7.0) hasta los valores postrigor (5.5), las proteínas miofibrilares (especialmente actina y miosina) se acercan a su pI. En ese estado, la capacidad de ligar agua se reduce, creándose espacios entre las miofibrillas. Esto genera pasos en el índice de refracción, dispersándose la luz a medida que atraviesa desde un medio a otro, lo que origina un incremento de la reflectividad. El grado de dispersión de la luz se incrementa con el tamaño de los espacios creados entre las miofibrillas y por la desnaturalización sufrida por las proteínas (Young y West, 2001). En concordancia con lo anterior, el ácido láctico generó los menores valores

de pH a lo largo del almacenamiento y, su luminosidad fue superior al resto de los tratamientos analizados. A pesar de que la carne inoculada con *L. carnis* y *L. pentosus* presentó menores valores de pH que la carne control, estas reducciones parecen no haber sido suficientes para reflejarse en un mayor nivel de L^* ($p>0.135$). Los menores valores de L^* se presentan al inicio del almacenamiento, incrementándose posteriormente conforme avanza el mismo y evidenciándose un efecto significativo del tiempo de almacenamiento sobre L^* ($p>0.017$) (figura 30a).

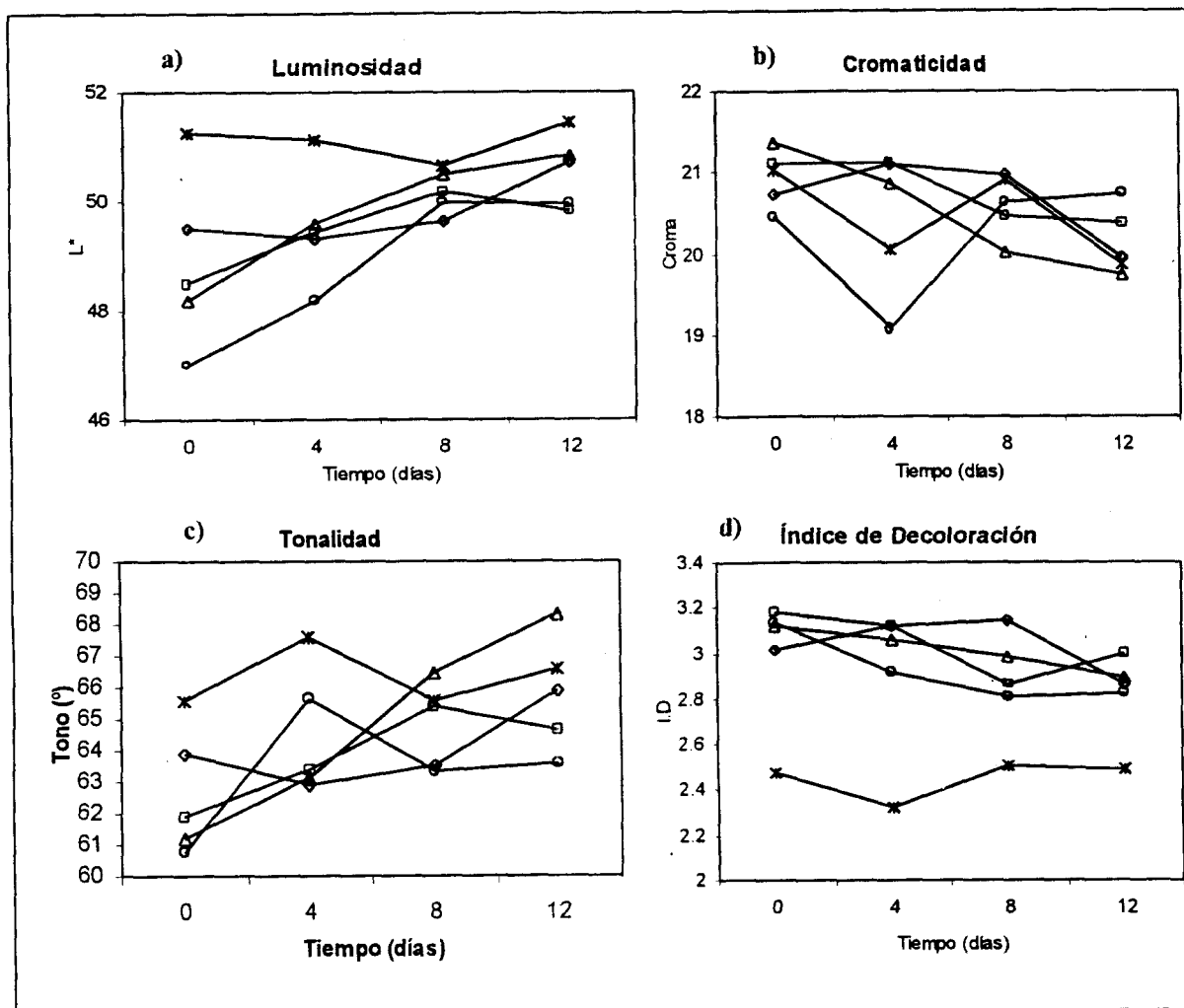


Figura 30: Parámetros de color de la carne almacenada a 4 °C.

Referencias : □, *L. carnis*; Δ, *L. pentosus*; ◇, *S. carnosus*; *, ácido láctico; O, control.

No se observó efecto significativo de ninguno de los tratamientos sobre la cromaticidad de la carne ($p>0.423$) (Anexo 1, tabla 31). Esto estaría indicando que los

tratamientos no afectaron a la intensidad del color presentado en la carne (figura 30b). No obstante, la cromaticidad presentó una tendencia a disminuir conforme avanzó el almacenamiento en refrigeración, siendo estadísticamente significativa la diferencia entre los valores alcanzados el día 12 de almacenamiento y los valores iniciales ($p > 0.031$).

La carne tratada con ácido láctico presentó los mayores valores de tonalidad, significativamente diferentes de los alcanzados por los restantes tratamientos ($p > 0.001$) (Anexo 1, tabla 32). El incremento en los valores de tonalidad estaría indicando una rotación en torno al eje de a^* y b^* (desde las tonalidades rojas hacia las amarillas), es decir, una decoloración de la carne (figura 30c). Este fenómeno de decoloración se desarrolla en función del tiempo, siendo la carne al inicio del almacenamiento la que presenta los menores valores de tonalidad ($p > 0.001$) e incrementándose los valores progresivamente a lo largo del almacenamiento. Este parámetro presentó, al igual que L^* , una correlación significativa con el pH cárnico ($p > 0.001$), siendo éste un factor a tener en cuenta para analizar la decoloración sufrida por la carne (Anexo 1, tabla 36).

El índice de decoloración (ID) es un parámetro útil, porque permite cuantificar la proporción de mioglobina con respecto a su estado oxidado, indeseable organolépticamente, la metamioglobina (Hunt, 1980). La carne tratada con ácido láctico muestra los menores niveles de ID, lo que representa una mayor proporción del pigmento cárnico en su forma oxidada ($p > 0.001$). El resto de los tratamientos no evidenciaron diferencias significativas entre ellos ($p > 0.330$) (Anexo 1, tabla 33). Al igual que lo observado para L^* y tonalidad, existe una correlación significativa entre el ID y el pH cárnico ($p > 0.001$) (Anexo 1, tabla 36), siendo este el factor más importante que controla el grado de decoloración (oxidación de la mioglobina) sufrida por la carne. A pesar de que el pH de la carne sufrió un descenso paulatino a lo largo del almacenamiento (figura 11), no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los ID para los diferentes tiempos de incubación ($p > 0.418$) (figura 30d). El ID observado en la carne tratada con ácido láctico fue inferior al de los restantes tratamientos desde el inicio del almacenamiento, sufriendo pocos cambios a lo largo del experimento. Los demás tratamientos no vieron alterado el ID inicial a lo largo del almacenamiento.

El músculo utilizado en el presente ensayo (*Psoas mayor*) es especialmente inestable en su color, debido a su alta tasa de consumo de oxígeno, baja penetración de oxígeno, bajo contenido de mioglobina y baja actividad reductora de metamioglobina (O'Keeffe y Hood, 1982; Madhavi y Carpenter, 1993).

La decoloración de la carne puede ser ocasionada también por la presencia de microorganismos alterantes (especialmente del género *Pseudomonas*), quienes generan una disminución en el O₂ disponible y facilitan la acumulación de metamioglobina, como ha sido reportado por Bala y col. (1978), Chan y col. (1995) y Abdallah y col. (1999). En nuestro caso, la carne tratada con ácido láctico fue la que presentó la mayor decoloración, a pesar de contener los menores recuentos de microorganismos alterantes.

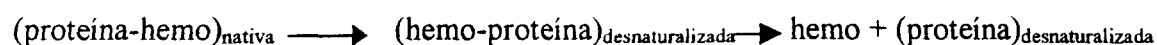
Ogden y col. (1994) reportan que tras la adición de ácidos orgánicos, con fines de incrementar la vida de anaquel, la carne se presenta pálida, con mayores valores de luminosidad y menores niveles de cromaticidad (aunque estos valores se incrementan con el tiempo de almacenamiento en refrigeración). Yin y Faustman (1993) reportaron incrementos en la concentración de metamioglobina en función del descenso del pH, empleando un sistema modelo. Un efecto similar del pH sobre los niveles de metamioglobina en carne fue reportado por Trout (1989).

El grupo hemo de la mioglobina se encuentra envuelto por la globina, que protege al grupo FeO₂ central impidiendo el fácil acceso a la molécula de agua o a sus iones conjugados (OH⁻ y H⁺). La cadena polipeptídica juega un papel importante en la estabilización del grupo hemo oxigenado y la integridad de la arquitectura de la proteína nativa es esencial para impedir el acceso de la molécula de agua hasta el grupo hemo. La desestabilización de la globina es el primer paso necesario para incrementar la tasa de autooxidación de la mioglobina (Shikama, 1998).

El anillo tetrapirrólico del grupo hemo presenta numerosos sitios de contacto con residuos de los aminoácidos superficiales de la globina (además de la unión covalente del hierro con la histidina 93, Fe-His⁹³). Los residuos de leucina 89, isoleucina 99, histidina 64

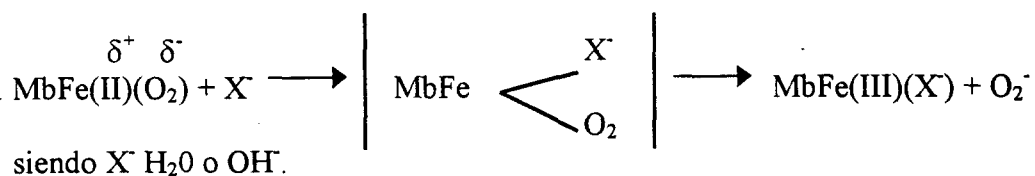
y valina 68 son los aminoácidos más importantes en la regulación de la unión del grupo hemo con la globina y en la generación de la envoltura protectora del Fe central (Hargrove y col., 1996; Cao y col., 2001).

Bajo condiciones ambientales de mediana acidez (4.5-5.5) la globina sufre un proceso de desnaturalización, evidenciada por una pérdida del contenido α -helicoidal, generándose un relajamiento de la estructura y la ruptura de los sitios de unión entre el grupo hemo y la proteína, dejándose expuesto el grupo hemo a sustancias de su entorno que bajo condiciones normales no tendrían acceso a él (Sage y col., 1991; Palaniappan y Bocian, 1994; Hargrove y col., 1996; Cao y col., 2001; Gutzke y Trout, 2002). El ácido es un agente desnaturalizante altamente específico, que actúa sobre un número limitado de sitios de unión con alta afinidad por los protones (Barrick y Baldwin, 1993). La transición desde el estado nativo al desnaturalizado incluye el desplegamiento de la estructura helicoidal de los segmentos B y E de la globina (dos tercios de la molécula) (Hargrove y col., 1994). Durante la desnaturalización inducida por ácidos el desplegamiento de la proteína ocurre antes de que la interacción hemo-proteína sea destruida y que una molécula de agua ocupe la quinta posición de ligando con el Fe central (Palaniappan y Bocian, 1994; Hargrove y Olson, 1996; Konermann y col., 1997; Das y col., 1998), a pesar de que esta ruptura acontece a mayor velocidad cuando el pH decrece (Hargrove y col., 1996). La secuencia de desnaturalización de la mioglobina podría esquematizarse de la siguiente forma (Konermann y col., 1997):



La unión FeO_2 de la oximioglobina es inherentemente estable, siendo improbable la disociación espontánea con la generación de un ion O_2^- . El oxígeno (O_2) es un aceptor pobre de electrones y por lo tanto existe una barrera termodinámica para la transferencia de electrones desde el Fe(II) al O_2 . En un ambiente con pH neutro, la oximioglobina parece estar protegida de la autooxidación por una barrera de energía de aproximadamente 26 Kcal. mol^{-1} requeridas para la formación de un complejo activado con la entrada de una molécula de agua. Esta barrera es 1.5 veces mayor que la necesaria para generar la

oxigenación del Fe(II). En un ambiente ácido, la autooxidación de la oximioglobina se incrementa rápidamente, debido al aumento en la concentración de los iones hidrógeno. De esta forma, la barrera de energía libre para la autooxidación de la oximioglobina se reduce hasta valores comparables o inferiores a la impuesta para la oxigenación de la mioglobina, es decir, la formación de metamioglobina se torna más favorable que la generación de oximioglobina (Shikama, 1998). Consecuentemente, el aumento en la tasa de autooxidación se incrementa con la concentración de iones hidrógeno, lo que se podría interpretar como un equilibrio entre el complejo Fe(II)O₂ y su forma acidificada Fe(III)HO₂⁺, la cual rápidamente se disocia. La reacción de autooxidación de la oximioglobina bajo condiciones fisiológicas puede ser visualizada como un mecanismo del tipo sustitución nucleofílica 2 (Shikama, 1998):



Lo expuesto anteriormente refuerza la idea de que los índices menores de decoloración evidenciados en la carne tratada con ácido láctico fueron debidos a una autooxidación inducida por un ambiente ácido. Además, la metamioglobina reductasa (localizada principalmente en la superficie mitocondrial) presenta su menor actividad cuando el pH cae por debajo de 5.6 (Lanari y Cassens, 1991; Young y West, 2001). La reducción en el índice de decoloración desde el inicio del almacenamiento (día 0), concuerda con lo reportado por Shikama (1998) al describir que la vida media de la oximioglobina es de 8 días cuando la estructura de la globina no ha sido alterada, reduciéndose a 15 minutos cuando la proteína sufre un proceso de desnaturalización.

6.10.2 Carne almacenada a 20 °C

Al igual que ocurría con la carne almacenada en condiciones de refrigeración, la luminosidad de la carne tratada con ácido láctico fue significativamente superior a la observada en la carne control ($p > 0.05$), no encontrándose diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ácido lácticos ($p > 0.142$) (Anexo 1, tabla 30). La carne tratada

con el ácido orgánico presentó los menores valores de pH a lo largo del almacenamiento, generándose un mayor espacio entre las miofibrillas y la desnaturalización de las proteínas cárnicas y traduciéndose en un incremento en la dispersión de la luz y, por ende, un mayor valor de L^* . La luminosidad de la carne al inicio del experimento mostró su valor más bajo ($p > 0.001$), incrementándose en los restantes días del almacenamiento (figura 31a). Este incremento gradual en los niveles de L^* acompaña la evolución del pH cárnico, observándose una correlación significativa ($p > 0.001$) entre ambos parámetros (Anexo 1, tabla 36).

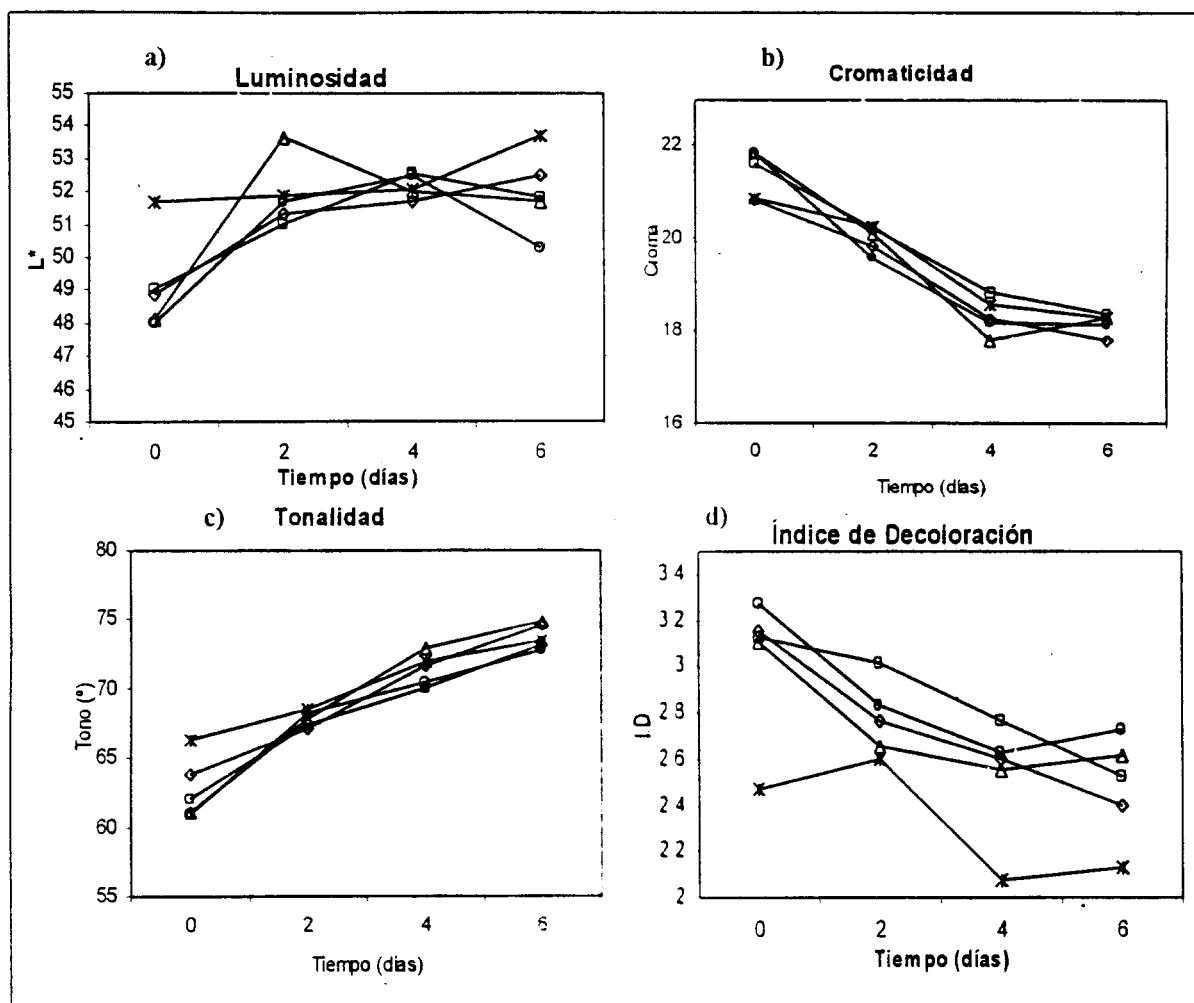


Figura 31: Parámetros de color en carne almacenada a 20 °C.
 Referencias : □, *L. carnis*; Δ, *L. pentosus*; ◊, *S. carnosus*; *, ácido láctico; O, control.

Los diferentes tratamientos no afectaron en forma significativa ($p>0.428$) la intensidad del color cárnico (cromaticidad). Este parámetro tampoco mostró diferencias significativas cuando la carne fue almacenada bajo refrigeración, pareciendo no ser sensible a los cambios sufridos por la mioglobina (figura 31b). Se observa un efecto significativo del tiempo de almacenamiento sobre la cromaticidad ($p>0.001$) (Anexo 1, tabla 31), ya que la intensidad del color sufre una disminución gradual y paulatina a lo largo del almacenamiento.

Si bien la carne tratada con ácido láctico presentó los mayores niveles de tonalidad, no llegó a apreciarse una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control ($p>0.054$). A medida que transcurrió el almacenamiento se observó un incremento en la tonalidad, reflejando la decoloración sufrida por la carne ($p>0.001$) (Anexo 1, tabla 32). Es posible observar, asimismo, una correlación significativa entre el pH y la tonalidad de la carne ($p>0.001$) (Anexo 1, tabla 36).

Los tratamientos aplicados no ejercieron efecto sobre la tonalidad y la cromaticidad de la carne almacenada a 20 °C. A pesar de que el pH cárnico fue inferior para la carne tratada con ácido láctico y que el pH está correlacionado con el tono, este último parámetro no mostró diferencias significativas al comparar los distintos tratamientos realizados. Una posible explicación a este fenómeno es que el pH de la carne inoculada con bacterias bioprotectoras y la carne control alcanzaron valores inferiores a 5.0 hacia el segundo día de almacenamiento, pudiendo ser estos valores lo suficientemente bajos como para causar efectos sobre el pigmento cárnico y no detectándose cambios mayores de los parámetros a pesar que el pH alcanzó valores inferiores (como ocurre en los tratamientos con ácido láctico).

La carne tratada con ácido láctico muestra la mayor decoloración, en comparación con los tratamientos restantes ($p>0.001$), cuando se evalúa el índice de decoloración cárnico (Anexo 1, tabla 33). Este parámetro sufre una disminución gradual a lo largo del período de almacenamiento ($p>0.001$) (figura 31d). Igualmente a lo observado cuando la carne se almacenó bajo condiciones de refrigeración, existe una correlación significativa

entre el ID y el pH de la carne ($p > 0.001$) (Anexo 1, tabla 36). Resulta interesante apreciar que el ID de la carne tratada con ácido láctico fue inferior a los restantes tratamientos desde el inicio del almacenamiento, sufriendo una progresiva declinación hasta el final del periodo. En contraposición, los restantes tratamientos sufrieron una reducción paulatina a lo largo del almacenamiento. La reducción del ID desde el día 0 del almacenamiento en la carne tratada con ácido láctico concuerda con el aumento, de aproximadamente 1000 veces, en la tasa de autooxidación cuando la globina se desnaturaliza y relaja su estructura, según lo reportado por Shikama (1998).

La explicación para los menores índices de decoloración mostrados por la carne tratada con ácido láctico fueron detalladamente expuestos en la sección de la carne almacenada a 4 °C. De forma adicional, el incremento en la temperatura aumenta la tasa de disociación del oxígeno desde su combinación reversible con la mioglobina e incrementa la tendencia a la autooxidación (O'Keeffe y Hood, 1982). Observaciones similares fueron reportadas por Yin y Faustman (1993) y Gutzke y Trout (2002), quienes concluyen que la autooxidación de la oximioglobina se incrementa en función de la temperatura de incubación, probablemente debido a una mayor ionización de los aminoácidos que protegen al grupo hemo, al aumento en la tasa de diferentes reacciones prooxidantes, a una disminución en la solubilidad del oxígeno y/o a un aumento en la tasa de consumo del mismo.

Los tratamientos ácido lácticos (especialmente el tratamiento con ácido láctico) lograron reducir las poblaciones de microorganismos alterantes en la carne envasada en refrigeración y en abuso térmico. El efecto fue más notorio en la carne almacenada en refrigeración, reforzando el concepto de que dos o más condiciones ambientales subóptimas actuando simultáneamente ejercen un efecto inhibitorio superior al evidenciado por cada una de ellas actuando separadamente. En el almacenamiento bajo abuso térmico la carga microbiana inicial fue muy elevada, lo que condicionó la acción inhibitoria de los tratamientos ácido lácticos. Este hecho se vio reflejado no solamente en las cuentas de microorganismos alterantes, sino en la concentración de aminas biogénicas indicadoras de

deterioro en carnes frescas (putrescina y cadaverina). El control efectivo de la carga microbiana alterante por parte de los tratamientos realizados se evidencia por medio del bajo pH cárnico que se mantuvo a lo largo del período de almacenamiento, en comparación con el aumento presentado en los valores del pH de la carne en el almacenamiento a 20 °C.

El ácido láctico presenta, en contraposición con la inhibición bacteriana, efectos indeseables sobre el color de la carne y la solubilidad proteica, la capacidad de gelificación y la actividad emulsionante de las proteínas miofibrilares en las dos condiciones de almacenamiento. Las bacterias bioprotectoras no contribuyen en dichos cambios negativos de las propiedades funcionales de la carne, más allá de los presentados en el período de almacenamiento. Los cambios debidos al propio período de almacenamiento son notorios en la carne almacenada bajo abuso térmico, especialmente por la proteólisis endógena que genera, el mayor crecimiento microbiano observado y la mayor velocidad de las reacciones deteriorantes.

CONCLUSIONES

7. Conclusiones

El ácido láctico fue el tratamiento más efectivo para controlar la proliferación de microorganismos alterantes en carne envasada a 4 y 20 °C. *L. carnis* y *L. pentosus* fueron los microorganismos bioprotectores con mayor actividad antagónica sobre las bacterias alterantes en carne a ambas temperaturas de almacenamiento.

No se evidenciaron diferencias entre la eficacia antibacteriana del microorganismo productor de bacteriocina (*L. carnis*) y *L. pentosus* (bacteria bioprotectora bacteriocina negativa).

Las bacterias bioprotectoras (especialmente *L. carnis* y *L. pentosus*) lograron adaptarse y crecer eficazmente en el sustrato cárnico, consiguiendo la mayor concentración de bacterias ácido lácticas en ambas temperaturas de almacenamiento.

El pH cárnico mostró sus menores valores cuando la carne fue tratada con ácido láctico, independientemente de la temperatura de almacenamiento. *L. carnis* y *L. pentosus* fueron capaces de disminuir el pH de la carne cuando ésta fue almacenada en refrigeración.

Los tratamientos ácido lácticos redujeron la concentración de histamina en carne cuando ésta fue almacenada bajo condiciones de abuso térmico. Para las restantes aminas biogénicas, las bacterias bioprotectoras se mostraron incapaces de reducir sus concentraciones en carne independientemente de la temperatura de almacenamiento. El tratamiento con ácido láctico consiguió las menores concentraciones de putrescina y tiramina en carne almacenada a 20 °C y de putrescina en carne almacenada en refrigeración. Esta menor concentración en las principales aminas biogénicas en carne es un reflejo de su actividad antibacteriana.

Los tratamientos ácido lácticos lograron reducir la actividad lipolítica en la carne almacenada a 4 °C al controlar la flora alterante con capacidad lipolítica.

Las principales proteínas miofibrilares sufrieron un importante proceso de hidrólisis cuando la carne se almacenó bajo abuso térmico, siendo superior el observado en la carne tratada con ácido láctico. El origen de esta proteólisis fue endógeno, ya que la carne inoculada con el ácido orgánico, alcanza valores de pH óptimos para la actividad de enzimas lisosomales (catepsinas).

Las propiedades de emulsificación no fueron modificadas por los tratamientos ácido lácticos empleados, excepto la capacidad de emulsión cuando la carne se almacenó en refrigeración. Las propiedades de emulsión están correlacionadas con otros factores como el pH cárnico, la concentración de grupos sulfhidrilos libres y la solubilidad de las proteínas miofibrilares, factores que modifican la estructura molecular de las proteínas y, por ende, sus propiedades como agentes emulsionantes.

El color de la carne se vio afectado por el tratamiento con ácido láctico, presentando una mayor luminosidad, un mayor índice de decoloración y una mayor tonalidad en las dos condiciones de almacenamiento, lo que evidencia una mayor tasa de autooxidación de la molécula de mioglobina. Esta alteración en el pigmento cárnico fue generada por el bajo pH cárnico alcanzado con dicho tratamiento. Los microorganismos bioprotectores no produjeron alteraciones en el color de la carne en ninguna de las dos temperaturas de almacenamiento.

Las propiedades de gelificación sufrieron deterioro en la carne tratada con ácido láctico, independientemente de la temperatura de almacenamiento. Esto se evidenció en la menor rigidez de los geles, medida a través de parámetros reológicos estáticos (prueba de penetración) y dinámicos (módulo de almacenamiento). Las bacterias bioprotectoras no generaron modificaciones en las propiedades de gelificación, en la carne almacenada a 4 °C y a 20 °C.

En la carne tratada con ácido láctico y almacenada a 20 °C la menor capacidad de gelificación se debió a la proteólisis sufrida por las principales proteínas miofibrilares y a modificaciones estructurales generadas por el bajo pH cárnico alcanzado. Cuando la carne

se almacenó en refrigeración, el deterioro en la capacidad de gelificación estuvo motivada exclusivamente por una desnaturalización y modificación en la estructura proteica debido al pH, ya que no se observó proteólisis sino hasta el final del almacenamiento.

El tratamiento de la carne con ácido láctico controla eficazmente la flora microbiana alterante y los metabolitos generados por su actividad sobre el sustrato cárnico, pero produce cambios significativos en las propiedades funcionales de la carne (especialmente color y gelificación). Las bacterias bioprotectoras (en especial *L. carnis* y *L. pentosus*) controlan la microflora alterante y no incurrir en modificaciones sobre las propiedades funcionales de la carne. Adicionalmente, las bacterias bioprotectoras no mostraron indicios de actividades proteolítica, lipolítica o aminodescarboxilante, propiedades importantes en la selección de microorganismos utilizados con el fin de prolongar la vida de anaquel de la carne cruda.

La presente tesis doctoral deja algunos interrogantes sin contestar que pueden ser motivo de trabajos futuros, algunos de ellos son:

1. realizar tratamientos combinados con ácido láctico y bacterias ácido lácticas. El empleo de ácido láctico en concentraciones inferiores a las empleadas en este trabajo podría reducir los efectos indeseables generados en las propiedades funcionales de las proteínas, controlar el crecimiento de microorganismos alterantes y/o patógenos que pudieran encontrar las circunstancias adecuadas para su multiplicación y permitir la recolonización de la superficie cárnica con microorganismos bioprotectores
2. utilizar dos o más microorganismos bioprotectores con diferente capacidad para crecer a temperaturas de refrigeración y abuso térmico (una cepa psicrótrófa y otra mesófila), imitando en el laboratorio las rupturas frecuentes en la cadena de frío a la que es sometida la carne cruda.

3. determinar el efecto de los tratamientos ácido lácticos sobre microorganismos patógenos presentes en la carne.
4. estudiar los cambios moleculares que acontecen en las proteínas miofibrilares (especialmente en la miosina) por acción del ácido láctico.
5. obtener información adicional (hidrofobicidad superficial, grado de desnaturalización proteica, etc.) para explicar las modificaciones en las propiedades de emulsificación de las proteínas miofibrilares sometidas a tratamientos ácido lácticos.

BIBLIOGRAFÍA

8. Bibliografía

ABEE, T.; KLAENHAMMER, T.R. y LETELLIER, L. 1994. "Kinetic studies of the action of Lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane". *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**(3):1006-1013.

ABDALLAH, M.B.; MARCHELLO, J.A. y AHMAD, H.A. 1999. "Effect of freezing and microbial growth on myoglobin derivatives of beef". *J. Agric. Food Chem.*, **47**(10):4093-4099.

ACTON, J.C. y DAWSON, P.L. 1994. "Color as Functional Property of Proteins". En Hettiachchy, N.S. y Zieglet, G.R. Ed. *Protein functionality in Food Systems*. Marcel Dekker Inc, Nueva York, EUA, p 357-381. ISBN 0-8247-9197-5.

ADAMS, D.M. y BRAWLEY, T.G. 1981. "Factors influencing the activity of a heat-resistant lipase of *Pseudomonas*". *J. Food Sci.*, **46**(3):677-680.

AHN, C. y STILES, M.E. 1990. "Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged meats". *J. Appl. Bacteriol.*, **69**(3):302-310.

ALANÍS-GARCÍA, E. 1997. "Acción de proteasas de *Pseudomonas* sp. sobre las proteínas contráctiles en un sistema modelo". Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México D.F, México.

ALANÍS, E; LARA, P. y GUERRERO, I. 1999. "Proteolytic activity of four strains of *Pseudomonas* on crude extracts of contractile proteins". *Food Chem.*, **67**(1):45-51.

ANCÍN, C.; SÁNCHEZ-MONGE, J.M.; VILLANUEVA, R. y BELLO, J. 1989a. "Estudio de la actividad superficial de las proteínas cárnicas en pastas finas comerciales, como un índice representativo de sus propiedades texturales". *Anales de Bromatología*, **XLI**(1):9-18.

ANCÍN, C.; SÁNCHEZ-MONGE, J.M.; VILLANUEVA, R. y BELLO, J. 1989b. "Influencia de la tecnología de curación sobre las características del sistema emulsión en productos cárnicos curados". *Anales de Bromatología*, **XLI**(1):19-29.

ANDERSEN, L. 1995. "Preservation of meat products with a lactic acid bacteria culture - FloraCarn L-2". En *Proceeding 41st Annual International Congress of Meat Science and Technology*, San Antonio, Texas, EUA, vol. II, p 303-304.

ANDERSON, M.E. y MARSHALL, R.T. 1989. "Interaction of concentration and temperature of acetic acid solution on reduction of various species of microorganisms on beef surfaces". *J. Food Prot.*, **52** (5):312-315.

ANDERSON, M.E. y MARSHALL, R.T. 1990. "Reducing microbial population on beef tissues: Concentration and temperature of an acid mixture". *J. Food Sci.*, **55**(4):903-905.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. 1990. "Official methods of analysis". 15th Edition, Vol. 2. Ed. AOAC, Inc., Washington, D.C. EUA, 1298 p. ISBN 0-935584-42-0.

ARIHARA, K.; ITOH, M. y KONDO, Y. 1995. "Significance of metmyoglobin reducing enzyme system in myocytes". En *41th International Congress of Meat Science and Technology*, San Antonio, Texas, EUA, p 378-379.

AYMERICH, T.; HOLO, H.; HAVARSTEIN, L.S.; HUGAS, M.; GARRIGA, M. y NES, I.F. 1996. "Biochemical and genetic characterization of Enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the Pediocin family of bacteriocins". *Appl. Environ. Microbiol.*, **62** (5):1676-1682.

AYMERICH, M.T. y HUGAS, M. 1998. "Estado actual de la bioconservación en productos cárnicos". *Eurocarne*, **Año VIII**, (72):39-49.

BADUI, S. 1999. "Química de los alimentos". Pearson Education, México, 648 p.

BALA, K.; MARSHALL, R.T.; STRINGER, W.C. y NAUMANN, H.D. 1978. "Effect of endocellular enzymes from *Pseudomonas fragi* on the color of beef and aqueous beef extract". J. Food Sci., **43**(3):684-688.

BARBUT, S. y MITTAL, G.S. 1989. "Effects of salt reduction on the rheological and gelation properties of beef, pork and poultry meat batters". Meat Sci., **26**:177-191.

BARBUT, S. Y MITTAL, G.S. 1990. "Effect of heating rate on meat batter stability texture and gelation". J. Food Sci., **55**(2):334-337.

BARBUT, S. 1994. "Protein Gel Ultrastructure and Functionality". En Hettiachchy, N.S. y Zieglet, G.R. Ed. *Protein functionality in Food Systems.* Marcel Dekker Inc, Nueva York, EUA, p 383-434. ISBN 0-8247-9197-5.

BARDÓCZ, S. 1995. "Polyamines in food and their consequences for food quality and human health". Trends Food Sci. Technol., **6**:341-346.

BARRICK, D. y BALDWIN, R.L. 1993. "Three-state analysis of sperm whale apomyoglobin folding". Biochem., **32**(14):3790-3796.

BARROSO, M.; CARECHE, M. y BORDERIAS, A.J. 1998. "Quality control of frozen fish using rheological techniques". Trends in Food Sci. & Technol., **9**:223-229.

BAUER, F.; SEUSS, y.; PAULSEN, P. Y VALI, S. 1994. "The formation of biogenic amines in meat and meat products". En *40th International Congress of Meat Science and Technology*, La Haya, Holanda.

BEARSON, S.; BEARSON, B. y FOSTER, J.W. 1997. "Acid stress responses in enterobacteria". *FEMS Microbiology Letters*, **147**:173-180.

BERTAZZON, A. y TSONG, T.Y. 1990. "Study of effects of pH on the stability of domains in myosin rod by high-resolution differential scanning calorimetry". *Biochem.*, **29**(27):6453-6459.

BERTAZZON, A.; TIAN, G.H.; LAMBLIN, A. y TSONG, T.Y. 1990. "Enthalpic and entropic contributions to actin stability: Calorimetry, circular dichroism, and fluorescence study and effects of calcium". *Biochemistry*, **29**(1):291-298.

BISWAS, S.R.; RAY, P.; JOHNSON, M.C. y RAY, B. 1991. "Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, Pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H". *Appl. Environ. Microbiol.*, **57** (4):1265-1267.

BLICKSTAD, E. y MOLIN, G. 1983. "The microbial flora of smoked pork loin and frankfurter sausage stored in different gas atmospheres at 4 °C". *J. Appl. Bacteriol.*, **54**(1):45-56.

BORPUZARI, R.N. y BORPUZARI, T. 1995. "Effect of lactic acid sprays on surface microflora of goat carcasses". En *Proceeding 41st Annual International Congress of Meat Science and Technology*, San Antonio, Texas, EUA, vol. II, p 295-296.

BOVER-CID, S.; HEINRICH, W. y HOLZAPFEL, H. 1999. "Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria". *Int. J. Food Microbiol.*, **53**:33-41.

BOVER-CID, S.; IZQUIERDO-PULIDO, M. y VIDAL-CAROU, M.C. 2001. "Changes in biogenic amine and polyamine contents in slightly fermented sausages manufactured with and without sugar". *Meat Sci.*, **57**:215-221.

-
- BOYER, C., JOANDEL, S.; ROUSSILHES, V.; CULIOLI, J. y OUALI, A. 1996. "Heat-induced gelation of myofibrillar proteins and myosin from fast- and slow-twitch rabbit muscle". *J. Food Sci*, **61**(6):1138-1142, 1164.
- BRAUN, P.; FEHLHABER, K.; KLUG, C. y KOPP, K. 1999. "Investigations into the activity of enzymes produced by spoilage-causing bacteria: a possible basis for improved shelf-life estimation". *Food Microbiol.*, **16**: 531-540.
- BREWER, M.S.; MCKEITH, F.; MARTIN, S.E.; DALLMIER, A.W. y MEYER, J. 1991. "Sodium lactate effects on shelf-life, sensory, and physical characteristics of fresh pork sausage". *J. Food Sci.*, **56** (5):1176-1178.
- BROCK, T.D. y MADIGAN, M.T. 1993. "Microbiología". Segunda edición en español traducida de la 6° edición en inglés. Ed. Prentice Hall Hispanoamericana S.A., México, 956 p. ISBN 968-880-325-1
- BRUL, S. y COOTE, P. 1999. "Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms". *Int. J. Food Microbiol.*, **50**:1-17.
- BRUNO, M.E. y MONTVILLE, T.J. 1993. "Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria". *Appl. Environ. Microbiol.*, **59** (9):3003-3010.
- BUSTA, F.F. 1982. "Combined effects of sorbic acid and other inhibitory factors in cured meat products". *Food Technol. in Australia*, **34** (11):529-532.
- BYUN, J.S.; PARK, K.S.; OH, D.H.; KIM, J.W. y LEE, M. 2000. "Comparison of indicators for microbial quality of meat during aerobic cold storage". En *46th International Congress of Meat Science and Technology*, Buenos Aires, Argentina, p 734-735.

-
- CAMERON, D.R.; WEBER, M.E.; IDZIAK, E.S.; NEUFELD, R.J. y COOPER, D.G. 1991. "Determination of interfacial areas in emulsions using turbidimetric and droplet size data: correlation of the formula for emulsifying activity index". *J. Agric. Food Chem.*, **39**(4):655-659.
- CAMOU, J.P.; SEBRANEK, J.G. y OLSON, D.G. 1989. "Effect of heating rate and protein concentration on gel strength and water loss of muscle protein gels". *J. Food Sci.*, **54**(4):850-854.
- CAMPBELL, R.J.; EGAN, A.F.; GRAU, F.H. y SHAY, B.J. 1979. "The growth of *Microbacterium thermosphactum* on beef". *J. Appl. Bacteriol.*, **47**(3):505-509.
- CAO, W.; CHRISTIAN, J.F.; CHAMPION, P.M.; ROSCA, F. y SAGE, T. 2001. "Water penetration and binding to ferric myoglobin". *Biochem.*, **40**:5728-5737.
- CAPLICE, E. y FITZGERALD, G.F. 1999. "Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation". *Int. J. Food Microbiol.*, **50**:131-149.
- CASSENS, R.G.; DEMEYER, D.; EIKELENBOOM, G.; HONIKEL, K.O.; JOHANSSON, G.; NIELSEN, T.; RENERRE, M.; RICHARDSON, Y. y SAKATA, R. 1995. "Recommendation of reference method for assessment of meat color". En *41th International Congress of Meat Science and Technology*, San Antonio, Texas, EUA, p 410-411.
- CHAN, J.K.; GILL, T.A. y PAULSON, A.T. 1993. "Thermal aggregation of myosin subfragments from cod and herring". *J. Food Sci.*, **58**(5):1057-1061, 1069.
- CHAN, W.K.M.; JOO, S.T.; HAKKARAINEN, K.; FAUSTMAN, C.; SCHAEFER, D.M. y LIU, Q. 1995. "Preliminary studies of bacterial challenge and antibiotic treatment related to beef discoloration". En *41th International Congress of Meat Science and Technology*, San Antonio, Texas, EUA, p 402-403.

CHANDER, H.; BATISH, V.K.; BABU, S. y SINGH, R.S. 1989. "Factors affecting amine production by a selected strain of *Lactobacillus bulgaricus*". J. Food Sci, **54**(4):940-942.

CHAWLA, S.P.; VENUGOPAL, V. y NAIR, P.M. 1996. "Gelation of proteins from washed muscle of Threadfin Bream (*Nemipterus japonicus*) under mild acidic conditions". J. Food Sci., **61**(2):362-366, 371.

CHEN, M.T.; OCKERMAN, H.W.; CAHILL, V.R.; PLIMPTON JR, R.F. y PARRETT, N.A. 1981. "Solubility of muscle proteins as a result of autolysis and microbiological growth". J. Food Sci., **46**(4):1139-1143.

CHOBERT, J.M.; BERTRAND-HARB, C. y MARIE-GEORGETTE, N. 1988. "Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin". J. Agric. Food Chem., **36** (5):883-892.

CHRISTIAN HANSEN. 1995. "Product information. Meat cultures". Horsholm, Denmark.

CLAEYS, E.; UYTTERHAEGEN, L.; BUTS, B. y DEMEYER, D. 1995. "Quantification of beef myofibrillar proteins by SDS-PAGE". Meat Sci., **39**:177-193.

COLLMAN, J.P. y FU, L. 1999. "Synthetic models for hemoglobin and myoglobin". Accounts of Chem. Research, **32**(6):455-463.

CONTRERAS, B.G.L.; DE VUYST, L.; DEVREESE, B.; BUSANYOVA, K.; RAYMAECKERS, J.; SABLON, E. y VANDAMME, E.J. 1997. "Isolation, purification and amino acid sequence of Lactobin A, one of the two bacteriocins produced by *Lactobacillus amylovorus* LMG P-13139". Appl. Environ. Microbiol., **63** (1):13-20.

CUDJOE, K.S. y KAPPERUD, G. 1991. "The effect of lactic acid sprays on *Campylobacter jejuni* inoculated into poultry carcasses". Acta Vet. Scand., **32**:491-498.

DAESCHEL, M.A. 1989. "Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives". *Food Technol.*, **43**(1):164-166.

DAINTY, R.H.; SHAW, B.G.; DE BOER, K.A. y SCHEPS, E.S.J. 1975. "Protein changes caused by bacterial growth on beef". *J. Appl. Bacteriol.*, **39**(1):73-84.

DAINTY, R.H.; SHAW, B.G. y ROBERTS, T.A. 1983. "Microbial and chemical changes in chill-stored red meats". *Food Microbiol.*, **1**:151-177.

DAINTY, R.H.; EDWARDS, R.A.; HIBBARD, C.M. y RAMANTANIS, S.V. 1986. "Bacterial sources of putrescine and cadaverine in chill stored vacuum-packaged beef". *J. Appl. Bacteriol.*, **61**(2):117-123.

DAMODARAN, S. 1994. "Structure-function relationship of food". En Hettiachchy, N.S. y Zieglet, G.R. Ed. *Protein functionality in Food Systems.* Marcel Dekker Inc, Nueva York, EUA, p 1-37. ISBN 0-8247-9197-5.

DAMODARAN, S. y ANAND, K. 1997. "Sulfhydryl-disulfide interchange-induced interparticle protein polymerization in whey protein-stabilized emulsions and its relation to emulsion stability". *J. Agric. Food Chem.*, **45**(10):3813-3820.

DAS, K.P. y KINSELLA, J.E. 1990. "Stability of Food Emulsions: Physicochemical Role of Protein and Non protein Emulsifiers". En Kinsella, J.E. Ed. *Advances in Food and Nutrition Research.* Academic Press, Inc., Londres, Inglaterra, p 81-202.

DAS, T.K.; KHAN, I.; ROUSSEAU, D.L. y FRIEDMAN, J.M. 1998. "Preservation of the native structure in myoglobin at low pH by sol-gel encapsulation". *J. Am. Chem. Soc.*, **120**:10268-10269.

-
- DAWES, C.J. 1971. "Biological techniques in electron microscopy". Barnes & Noble, Inc., Nueva York, EUA, 193 p. ISBN 38900464-2
- DE VUYST, L. y VANDAME, E.J. 1994. "Antimicrobial potential of LAB" En De Vuyst y Vandame Eds., *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Nueva York, EUA, Blackie Academic and Professional, p 92-129.
- DIXON, Z.R.; ACUFF, G.R.; LUCIA, L.M.; VANDERZANT, C.; MORGAN, J.B.; MAY, S.G. y SAVELL, J.W. 1991. "Effect of degree of sanitation from slaughter through fabrication on the microbiological and sensory characteristics of beef". *J. Food Protec.*, **54**:200-207.
- EAGERMAN, B.A.; CLYDESDALE, F.M. y FRANCIS, F.J. 1978. "A rapid reflectance procedure for following myoglobin oxidative or reductive changes in intact beef muscle". *J. Food Sci.*, **43**(2):468-469.
- EDWARDS, R.A.; DAINTY, R.H. y HIBBARD, C.M. 1985. "Putrescine and cadaverine formation in vacuum packed beef" *J. Appl. Bacteriol.*, **58**(1):13-19.
- EDWARDS, R.A.; DAINTY, R.H.; HIBBARD, C.M. y RAMANTANIS, S.V. 1987. "Amines in fresh beef of normal pH and the role of bacteria in changes in concentration observed during storage in vacuum packs at chill temperatures". *J. Appl. Bacteriol.*, **62**(5):427-434.
- EEROLA, S.; MAIJALA, R.; ROIG-SAGUÉS, A.X.; SALMINEN, M. y HIRVI, T. 1996. "Biogenic amines in dry sausages as affected by starter culture and contaminant amine-positive *Lactobacillus*". *J. Food Sci.*, **61**(6):1243-1246.
- EGAN, A.F. y SHAY, B.J. 1982. "Significance of *Lactobacilli* and film permeability in the spoilage of vacuum-packaged beef". *J. Food Sci.*, **47**(4):1119-1126.

-
- ETHERINGTON, D.J. 1987. "Conditioning of meat - factors influencing protease activity". En Romita, A.; Valin, C. y Taylor, A.A. Eds., *Accelerated processing of meat*. Ed. Elsevier Applied Science, Londres, Inglaterra, p 21-28.
- FAUSTMAN, C.; LIEBLER, D.C.; McCLURE, T.D. y SUN, Q. 1999. " α,β -Unsaturated aldehydes accelerate oxymyoglobin oxidation". *J. Agric. Food Chem.*, **47**(8):3140-3144.
- FIELDS, F.O. 1996. "Use of bacteriocins in food: regulatory considerations". *J. Food Protec.*, Supplement:72-77.
- FINDLAY, C.J. y STANLEY, D.W. 1984. "Differential scanning calorimetry of beef muscle: influence of postmortem conditioning". *J. Food Sci.*, **49**(6):1513-1516.
- FLORES, J. y BERMELL, S. 1985. "Capacidad de emulsión de las proteínas miofibrilares". *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.*, **25**(4):481-489.
- FLORES, J. y BERMELL, S. 1986. "Capacidad de gelificación de las proteínas miofibrilares". *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* **26**(3):318-324.
- FOEGEDING, E.A.; ALLEN, C.E. y DAYTON, W.R. 1986. "Effect of heating rate on thermally formed myosin, fibrinogen and albumin gels". *J. Food Sci.*, **51**(1): 104-108, 112.
- GALLUZZO, S.J. y REGENSTEIN, J.M. 1978. "Role of chicken breast muscle proteins in meat emulsion formation: myosin, actin and synthetic actomyosin". *J. Food Sci.*, **43**(6):1761-1765.
- GARDNER, G.A. 1966. "A selective medium for the enumeration of *Microbacterium thermosphactum* in meat and meat products". *Journal Applied Bacteriology*, **29**(3):455-460.

-
- GARRIGA, M.; MARCER, M. y HUGAS, M. 1996. "Microbiología de la carne fresca y productos cárnicos envasados". Eurocarne Año VI, (49):69-73.
- GASKA, M.T. y REGENSTEIN, J.M. 1982. "Timed emulsification studies with chicken breast muscle: soluble and insoluble myofibrillar proteins". J. Food Sci., 47(5):1438-1443.
- GERMAN J.B. y PHILLIPS, L. 1994. "Protein Interactions in Foams: Protein-Gas Phase Interactions". En Hettichachy, N.S. y Ziegler, G.R. Ed., *Protein functionality in Food Systems*. Marcel Dekker Inc, Nueva York, EUA, p 181-208. ISBN 0-8247-9197-5.
- GILBERT, E.J.; CORNISH, A. y JONES, C.W. 1991. "Purification and properties of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF2". J. Gen. Microbiol., 137:2223-2229.
- GILL, C.O. 1976. "Substrate limitation of bacterial growth at meat surfaces". J. Appl. Bacteriol., 41(3):401-410.
- GILL, C.O. y NEWTON, K.G. 1980. "Growth of bacteria on meat at room temperatures". J. Appl. Bacteriol., 49(2):315-323.
- GILL, C.O. y PENNEY, N. 1982. "Bacterial penetration of muscle tissue". J. Food Sci., 47(2):690-691.
- GREER, G.G. 1988. "Bacteria and meat quality". Presentado en la 31 Conferencia Anual del Instituto Canadiense de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Winnipeg, Canadá.
- GREER, G.G. 1989. "Red meats, poultry and fish". En McKellar, R.C. Ed. *Enzymes of Psychrotrophs in Raw Food*. CRC Press, Inc; Boca Raton, Florida, EUA, p 267-292. ISBN 0-8493-6103-6.

GREER, G.G. y JONES, S.D.M. 1991. "Effects of lactic acid and vacuum packaging on beef processed in a research abattoir". *Can. Inst. Sci. Technol. J.*, **24** (3-4):161-168.

GREER, G. y DILTS, B.D. 1994. "Lactic acid inhibits growth on pork lean and fat". En *40th International Congress of Meat Science and Technology*, La Haya, Holanda.

GUERRERO-LEGARRETA, I. y CHÁVEZ-GALLARDO, A.M. 1991. "Detection of biogenic amines as meat spoilage indicators". *J. Muscle Foods*, **2** (4):263-278.

GUERRERO, I. y TAYLOR, A.J. 1994. "Meat surface decontamination using lactic acid from chemical and microbial sources". *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, **27**:201-209.

GUERRERO-LEGARRETA, I.; MENDIOLEA, R.; PONCE, E. y PRADO, A. 1995. "Inoculation of lactic acid bacteria on meat surfaces as a means of decontamination in semitropical conditions". *Meat Sci.*, **40**(3):397-411.

GUIDOLIN MILANI, L.I.; SCHUCH BOEIRA, L.; SORIANO BESSA, L.; DIAS DE AVILA, L.; LAZZERI, J.B.; MARTINS FRIES, L.L. y TERRA, N.N. 1998. "Inhibición de microorganismos indeseables en la superficie de las canales de pollo refrigeradas". *Eurocarne Año VIII*, (67):61-70.

GUILLÉN-VELASCO, S.; PONCE-ALQUICIRA, E. y GUERRERO-LEGARRETA, I. 2001. "Growth of histamine-producing bacteria in tuna (*Tunnus thynnus*) and its possible reduction by lactic fermentation". En *2001 IFT Annual Meeting*, Nueva Orleans, EUA, p 224.

GUTZKE, D. y TROUT, G.R. 2002. "Temperature and pH dependence of the autoxidation rate of bovine, ovine, porcine and cervine oxymyoglobin isolated from three different muscles -*Longissimus dorsi*, *Gluteus medius*, and *Biceps femoris*". *J. Agric. Food Chem.*, **50**:2673-2678.

-
- HALÁSZ, A.; BARÁTH, Á.; SIMON-SARKADI, L. y HOLZAPFEL, W. 1994. "Biogenic amines and their production by microorganisms in food". *Trends in Food Sci. Technol.*, **5**:42-49.
- HALL, G.M. 1996. "Basic Concepts". En Hall, G.M. Ed., *Methods of the Testing Protein Functionality* 1º Edición. Editorial Blackie Academic & Professional, Londres, Inglaterra, p 265. ISBN: 0-7514-0053-X.
- HAMANN, D.D.; AMATO, P.M.; WU, M.C. y FOEGEDING, E.A. 1990. "Inhibition of Modori (Gel Weakening) in surimi by plasma hydrolysate and egg white". *J. Food Sci.*, **55**(3):665-669, 795.
- HARGROVE, M.S.; KRZYWDA, S.; WILKINSON, A.J.; DOU, Y.; IKEDA-SAITO, M. y OLSON, J.S. 1994. "Stability of myoglobin: A model for the folding of heme proteins". *Biochemistry*, **33**(39):11767-11775.
- HARGROVE, M.S.; WILKINSON, A.J. y OLSON, J.S. 1996. "Structural factors governing heme dissociation from metmyoglobin". *Biochemistry*, **35**(35):11300-11309.
- HARGROVE, M.S. y OLSON, J.S. 1996. "The stability of holomyoglobin is determined by heme affinity". *Biochemistry*, **35**(35):11310-11318.
- HERNÁNDEZ-JOVER, T.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; MARINÉ-FONT, A. y VIDAL-CAROU, M.C. 1997. "Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products". *J. Agric Food Chem.*, **45**(6):2098-2102.
- HERNÁNDEZ, P.; NAVARRO, J.L. y TOLDRA, F. 1998. "Lipid composition and lipolytic enzyme activities in porcine skeletal muscles with different oxidative pattern". *Meat Sci.*, **49**(1):1-10.

-
- HICKSON, D.W.; DILL, C.W.; MORGAN, R.G.; SWEAT, V.E.; SUTER, D.A. y CARPENTER, Z.L. 1982. "Rheological properties of two heat-induced protein gels". *J Food Sci.*, **47**(3):783-785, 791.
- HILL, S.E. 1996. "Emulsions". En Hall, G.M Ed., *Methods of Testing Protein Functionality*. 1^{ra}. Edición. Blackie Academic & Professional, Londres, Inglaterra, p 153-185. ISBN 0 7514 0053 X.
- HITCHENER, B.J.; EGAN, A.F. y ROGERS, P.J. 1982. "Characteristics of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged beef". *J Appl. Bacteriol.*, **52**(1):31-37.
- HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T. y WILLIAMS, S. T. 1994. "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". 9^o Edición. Editorial Williams & Wilkins, Baltimore, Mayland, EUA, 787 p. ISBN: 0-683-00603-7.
- HOTCHKISS, J.H. 1988. "Experimental approaches to determining the safety of food packaged in modified atmospheres". *Food Technol.*, **42**(9):55-64.
- HUGAS, M. 1993. "Acción antimicrobiana de las bacterias lácticas: sistemas naturales de conservación de los alimentos". *Eurocarne*, **Año III**, (45):47-52.
- HUGAS, M.; GARRIGA, M.; AYMERICH, M.T. y MONFORT, J.M. 1995. "Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494". *J. Appl. Bacteriol.*, **79**(3):322-330.
- HUGAS, M. 1996. "Patente de una cepa de *Enterococcus faecium* CTC492 productora de bacteriocinas contra *Listeria monocytogenes*". *Eurocarne*, **Año VI**, (50):45-49.
- HUGAS, M. 1998. "Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products". *Meat Sci.*, **49** (Suppl. 1):S139-S150.

-
- HULTIN, H.O. 1993. "Características del tejido muscular". En Fennema, O. R. Ed. *Química de los alimentos*. ACRIBIA S.A. Zaragoza, España, p 815-881. ISBN 84-200-0733-1.
- HUNG, S.C. y ZAYAS, J.F. 1991. "Emulsifying capacity and emulsion stability of milk proteins and corn germ protein flour". *J. Food Sci.*, **56**(5):1216-1218, 1223.
- HUNT, M.C. 1980. "Meat color measurements". *En 33 Annual Reciprocal Meat Conference Proceedings*, West Lafayette, Indiana, EUA, **33**:41-46.
- HWANG, D.F.; CHANG, S.H.; SHIUA, C.Y. y CHENG, C.C. 1995. "Biogenic amines in the flesh of sailfish (*Istiophorus platypterus*) responsible for scombroid poisoning". *J. Food Sci.*, **60**(5):926-928.
- HWANG, D.F.; CHANG, S.H.; SHIUA, C.Y. y CHAI, T.J. 1997. "High-Performance Liquid Chromatographic of Biogenic Amines in Fish Implicated in Food Poisoning". *J. Chromatograph. B*, **693**:23-30.
- HWANG, I.H.; LIN, C.W. y CHOW, R.G.R. 2000. "Effect of lactic acid or acetic acid on degradation of myofibrillar proteins in post-mortem goose (*Anser anser*) breast muscle". *J. Sci. Food Agric.*, **80**:231-236.
- ISHIOROSHI, M.; SAMEJIMA, K. y YASUI, T. 1979. "Heat-Induced Gelation of Myosin: Factors of pH and Salt Concentrations". *J. Food Sci.*, **44**(5):1280-1284.
- ITO, T.; KYUNG SUNG, S. y FUKAZAWA, T. 1978. "Change of acto-heavy meromyosin ATPase of rabbit skeletal muscle during postmortem storage". *J. Agric. Food Chem.*, **26**(2):324-326.
- JAY, J.M. y SHELEF, L.A. 1976. "Effect of microorganisms on meat proteins at low temperatures". *J. Agric. Food Chem.*, **24** (6):1113-1116.

JACK, R.W.; TAGG, J.R. y RAY, B. 1995. "Bacteriocins of gram positive bacteria". *Microbiol. Rev.*, **59** (2):171-200.

JIMÉNEZ-COLMENERO, F.; CARECHE, J.; CARBALLO, J. y COFRADES, S. 1994. "Influence of thermal treatment on gelation of actomyosin from different myosystems" *J. Food Sci.*, **59**(1): 211-215, 220.

JOHANSSON, G.; BERDAGUÉ, J.L.; LARSSON, M.; TRAN, N. y BORCH, E. 1994. "Lipolysis, proteolysis and formation of volatile components during ripening of a fermented sausage with *Pediococcus pentosaceus* and *Staphylococcus xylosus* as starter cultures". *Meat Sci.*, **38**: 203-218.

JOHNS, A.M.; BIRKINSHAW, L.H. y LEDWARD, D.A. 1989. "Catalysts of lipid oxidation in meat products". *Meat Sci.*, **25**:209-220.

KAUFFMAN, R.G. 2001. "Meat Composition". En Hui, Y.H.; Nip, W.K.; Rogers, R.W. y Young O.A. Eds., *Meat Science and Applications*. Marcel Dekker, Inc., Nueva York, EUA, p. 1-20. ISBN 0-8247-0548-3.

KENNEALLY, P.M.; LEUSCHNER, R.G. y ARENDT, E.K. 1998a. " Evaluation of the lipolytic activity of starter cultures for meat fermentation purposes". *J. Appl Microbiol.*, **84**(5):839-846.

KENNEALLY, P.M.; SCHWARZ, G.; FRANSEN, N.G. y ARENDT, E.K. 1998b. "Lipolytic starter culture effects on production of free fatty acids in fermented sausages". *J. Food Sci.*, **63**(3):538-543.

KLAENHAMMER, T.R. 1988. "Bacteriocins of lactic acid bacteria". *Biochimie*, **70**:337-349.

KLETTNER, P.G. 1995. "Meat and meat products. Measuring texture and consistency with testing machines". *Fleischwirtsch international*, (2):36-36.

KONERMANN, L.; ROSELL, F.I.; MAUK, A.G. y DOUGLAS, D.J. 1997. "Acid-induced denaturation of myoglobin studied by time-resolved electrospray ionization mass spectrometry". *Biochemistry*, **36**(21):6448-6454.

KORDEL, M.; HOFMANN, B.; SCHOMBURG, D. y SCHMID, R.D. 1991. "Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization and preliminary X-ray diffraction data". *J. Bacteriol.*, **173**(15):4836-4841.

KRISTINSSON y RASCO. 2000. "Biochemical and functional properties of atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases". *J. Agric. Food Chem*, **48**(3):657-666.

LAEMMLI, U.K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature*, **227**(5259):680-685.

LAMKEY, J.W.; LEAK, F.W.; TULEY, W.B.; JOHNSON, D.D. y WEST, R.L. 1991. "Assessment of sodium lactate addition to fresh pork sausage". *J. Food Sci.*, **56** (1):220-223.

LAN, Y.H.; NOVAKOFSKI, J.; McCUSKER, R.H.; BREWER, M.S.; CARR, T.R. y McKEITH, F.K. 1995a. "Thermal gelation properties of protein fractions from pork and chicken breast muscle". *J. Food Sci.*, **60**(4):752-747,752.

LAN, Y.H.; NOVAKOFSKI, J.; McCUSKER, R.H.; BREWER, M.S.; CARR, T.R. y McKEITH, F.K. 1995b. "Thermal gelation of pork, beef, fish, chicken and turkey muscles as affected by heating rate and pH". *J. Food Sci.*, **60**(5):936-940,945.

LAN, Y.H.; NOVAKOFSKI, J.; McCUSKER, R.H.; BREWER, M.S.; CARR, T.R. y McKEITH, F.K. 1995c. "Thermal gelation of myofibrils from pork, beef, fish, chicken and turkey". J. Food Sci., **60**(5):941-945.

LANARI, M.C. y CASSENS, R.G. 1991. "Mitochondrial activity and beef muscle color stability". J. Food Sci., **56**(6):1476-1479.

LANARI, M.C.; SCHAEFER, D.M.; LIU, Q. y CASSENS, R.G. 1996. "Kinetic of pigment oxidation in beef from steers supplemented with vitamin E". J. Food Sci, **61**(5):884-889.

LARPENT, J.P. 1995. "Las bacterias lácticas" En Bourgeois, C.M. y Larpent, J.P. Ed, *Microbiología Alimentaria. Vol. II.(Fermentaciones Alimentarias)*. ACRIBIA S.A., Zaragoza España, p. 3-17.

LASTA, J.A. y GIMENO, E.J. 1993. "Hygiene conditions of beef carcasses and cuts in Argentine meat packing plants". Fleischwirtschaft, **73**:1-3.

LAWRIE, R.A. 1977. "Ciencia de la carne" Ed. ACRIBIA S.A. Zaragoza, España, 456 p. ISBN 84-200-0292-5.

LEFEVRE, F.; FAUCONNEAU, B.; OUALI, A. y CULIOLI, J. 1998. "Thermal gelation of brown trout myofibrils: Effect of muscle type, heating rate and protein concentration". J. Food Sci., **63**(2):299-304.

LEYER, G. y JOHNSON, E.A. 1993. "Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella typhimurium*". Applied and Environmental Microbiology, **59**(6):1842-1847.

LIBBY, J.A. 1986. "Higiene de la Carne". Ed. Cia. Editorial Continental S.A. de C.V., México, 659 p. ISBN 0-8121-0466-8.

-
- LI-CHAN, E.; NAKAI, S. y WOOD, D.F. 1984. "Hydrophobicity and solubility of meat proteins and their relationship to emulsifying properties". J. Food Sci., **49**(2):345-350.
- LI-CHAN, E.; NAKAI, S. y WOOD, D.F. 1985. "Relationship between functional (fat binding, emulsifying) and physicochemical properties of muscle proteins. Effects of heating, freezing, pH and species". J. Food Sci., **50**(4): 1034-1040.
- LITTLE, A.C. 1975. "Off on a tangent". J. Food Sci., **40**:410-411.
- LIU, M.N.; FOEGEDING, E.A.; WANG, S.F.; SMITH, D.M. y DAVIDIAN, M. 1996. "Denaturation and aggregation of chicken myosin isoforms". J. Agric. Food Chem., **44**(6):1435-1440.
- LIU, G. y XIONG, Y.L. 1997. "Gelation of chicken muscle myofibrillar proteins treated with protease inhibitors and phosphates". J. Agric. Food Chem., **45**(9):3437-3442.
- LIVINGSTON, D.J. y DUANE BROWN, W. 1981. "The chemistry of myoglobin and its reactions". Food Technol.**35**(5):244-251.
- LYNCH, M.P. y FAUSTMAN, C. 2000. "Effect of aldehyde lipid oxidation products on myoglobin". J. Agric. Food Chem., **48**(3):600-604.
- MAAS, M.R.; GLASS, K.A. y DOYLE, M.P. 1989. "Sodium lactate delays toxin production by *Clostridium botulinum* in cook-in-bag turkey products". Appl. Environ. Microbiol., **55** (9):2226-2229.
- MACA, J.V.; MILLER, R.K. y ACUFF, G.R. 1995. "Sodium lactate, sodium citrate, sodium acetate and sodium propionate effects on the sensory, microbiological and chemical characteristics of vacuum-packaged ground beef". En Proceeding *41st Annual International Congress of Meat Science and Technology*, San Antonio, Texas, EUA, vol. II, p 301-302.

-
- MACA, J.V.; MACA, J.D. y ACUFF, G.R. 1997a. "Microbiological, sensory and chemical characteristics of vacuum-packaged cooked beef top runds treated with sodium lactate and sodiura propionate". *J. Food Sci.*, **62**(3):586-590, 596.
- MACA, J.V.; MACA, J.D. y ACUFF, G.R. 1997b. "Microbiological, sensory and chemical characteristics of vacuum-packaged beef patties treated with salts of organic acids". *J. Food Sci.*, **62**(3):591-596.
- MADHAVI, D.L. y CARPENTER, C.E. 1993. "Aging and processing affect color, metmyoglobin reductase and oxygen consumption of beef muscles". *J. Food Sci.*, **58**(5):939-942, 947.
- MAHMOUD, M.I.; MALONE, W.T. y CORDLE, C.T. 1992. "Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties". *J. Food Sci.*, **57**(5):1223-1229.
- MAIJALA, R.; EEROLA, S.; LIEVONEN, S.; HILL, P. y HIRVI, T. 1995. "Formation of biogenic amines during ripening dry sausages as affected by starter culture and thawing time or raw materials". *J. Food Sci.*, **60** (6):1187-1190.
- MANGINO, M.E. 1994. "Protein Interactions in Emulsion: Protein-Lipid Interactions". En Hettiachchy, N.S. y Zieglet, G.R. Ed. *Protein functionality in Food Systems*. Marcel Dekker Inc, Nueva York, EUA, p. 147-180. ISBN 0-8247-9197-5.
- MARSHALL, D.L. y BAL'A, M.F. 2001. "Microbiology of Meats". En Hui, Y.H.; Nip, W.K.; Rogers, R.W. y Young O.A. Eds., *Meat Science and Applications*. Marcel Dekker, Inc., Nueva York, EUA, p. 149-170. ISBN 0-8247-0548-3.
- MARUYHAMA, K.; MURAKAMI, F. y OHASHI, K. 1977. "Connectin and elastic protein of muscle. Characterization and function". *J. Biochem.*, **82**:317-337.

MASS, M.R.; GLASS, K.A. y DOYLE, M.P. 1989. "Sodium lactate delays toxin production by *Clostridium botulinum* in cook-in-bag turkey products". J. Food Sci., **55**(9):2226-2229.

MASSON, F.; TALON, R. y MONTEL, M.C. 1996. "Histamine and tyramine production by bacteria from meat products". Int. J. Food Microbiol., **32**:199-207.

MATSUMURA, Y. y MORI, T. 1996. "Gelation". En Hall, G.M Ed., *Methods of Testing Protein Functionality*. 1^{ra}. Edición. Blackie Academic & Professional, Londres, Inglaterra, p 76-109. ISBN 0 7514 0053 X.

McAULIFFE, O.; RYAN, M.P.; ROSS, R.P.; HILL, C.; BREEUWER, P. y ABEE, T. 1998. "Lactacin 3147, a broad-spectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potential". Appl. Environ. Microbiol., **64** (2):439-445.

McKELLAR, R.C. 1982. "Factor influencing the production of extracellular proteinase by *Pseudomonas fluorescens*". J. Appl. Bacteriol., **53**(3):305-316.

MENDONCA, A.F.; MOLINS, R.A.; KRAFT, A.A. y WALKER, H.W. 1989. "Microbiological, chemical and physical changes in fresh, vacuum-packaged pork treated with organic acids and salts". J. Food Sci., **51** (1): 18-21.

MINOR-PÉREZ, H. 1998. "Cambios en parámetros fisicoquímicos relacionados con la calidad de la carne de cerdo sometida a fermentación láctica como método de bioconservación". Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México D.F, México.

MOLL, G.N.; KONINGS, W.N. y DRIESSEN, A.J.M. 1999. "Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation". Antonie van Leeuwenhoek, **76**(1-4):185-198.

MONFORT, J.M.; HUGAS, M.; PAGES, F. y GARRIGA, M. 1996. "Comparación de diferentes lactobacilos productores de bacteriocina sobre el crecimiento de *Listeria* en salchichones". Eurocarne, **Año VI**, (48):51-55.

MOON, N.J. 1983. "Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures". J. Appl. Bacteriol., **55**(3):453-460.

MORITA, J.I. y OGATA, T. 1991. "Role of light chains in heat-induced gelation of skeletal muscle myosin". J. Food Sci., **56**(3):855-856.

MORZEL, M.; VERREZ-BAGNIS, V.; ARENDT, E.K. y FLEURENCE, J. 2000. "Use of two dimensional electrophoresis to evaluate proteolysis in salmon (*Salmo salar*) muscle as affected by a lactic fermentation". J. Agric. Food Chem., **48**(2):239-244.

NAKAI, S. 1983. "Structure-function relationships of food proteins with an emphasis on the importance of protein hydrophobicity". J. Agric. Food Chem., **31**(4):676-683.

NASSOS, P.S.; KING, A.D. y STAFFORD, A.E. 1983. "Relationship between lactic acid concentration and bacterial spoilage in groun beef". Appl. Environ. Microbiol., **46** (4):894-900.

NASSOS, P.S.; KING, A.D. y STAFFORD, A.E. 1985. "Lactic acid concentration and microbial spoilage in anaerobically and aerobically stored ground beef". J. Food Sci., **50**(3):710-715.

NATTRESS, F.M.; WOROBO, R.J.; GORDON-GREER, G. y JEREMIAH, L.E. 1998. "Effect of lactic acid bacteria on beef flavour" En *Proceeding 44th Annual International Congress of Meat Science and Technology*, Barcelona, España, vol. I, p 326-327.

NES, I.F.; DIEP, D.B.; HAVARSTEIN, L.S.; BRURBERG, M.B.; EIJSINK, V. y HOLO, H. 1996. "Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria". *Antonie van Leeuwenhoek*, **70**:113-128.

NGAPO, T.; WILKINSON, B.; CHONG, R. y HAISMAN, D. 1992. "Gelation of bovine myofibrillar protein induced by 1,5-Gluconolactone". En *38th International Congress of Meat Science and Technology*, Clermont-Ferrand, Francia, p 1095-1.098.

NIKU-PAAVOLA, M.L.; LAITILA, A.; MATTILA-SANDHOLM, T. y HAIKARA, A. 1999. "New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*". *J. Appl. Microbiol.*, **86**(1):29-35.

NISSEN, H.; MAUGESTEN, T. y LEA, P. 2001. "Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella enteritidis* on decontaminated and untreated meat". *Meat Sci.*, **57**:291-298.

NIVEN, C.F.; JEFFREY, M.B. y CORLETT, D.A. 1981. "Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria". *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**(1):321-322.

NYCHAS, G.J.; DILLON, V.M. y BOARD, R.G. 1988. "Glucose, the key substrate in the microbiological changes occurring in meat and certain meat products". *Biotech. Appl. Biochem.*, **10**:203-231.

OGDEN, S.K.; GUERRERO, I. y TAYLOR, A.J. 1994. "Changes in flavour, colour and texture during storage of acid-preserved meat". En *40th International Congress of Meat Science and Technology*, La Haya, Holanda.

O'GRADY, M.N.; MONAHAN, E.J. y BRUNTON, N.P. 2001. "Oxymyoglobin oxidation and lipid oxidation in bovine muscle-Mechanistic studies". *J. Food Sci.*, **66**(3):386-392.

O'KEEFFE, M. y HOOD, D.E. 1982. "Biochemical factors influencing metmyoglobin formation on beef from muscle of differing colour stability". *Meat Sci.*, 7:209-228.

OKEREKE, A. y MONTVILLE, T.J. 1991. "Bacteriocin-mediate inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria at refrigeration and abuse temperatures". *Appl. Environ. Microbiol.*, 57 (12):3423-3428.

PALANIAPPAN, V. y BOCIAN, D.F. 1994. "Acid-induced transformations of myoglobin. Charaterization of a new equilibrium heme-pocket intermediate". *Biochemistry*, 33(47):14264-14274.

PAPADOPOULOS, L.S.; MILLER, R.K.; ACUFF, G.R.; VANDERZANT, C. y CROSS, H.R. 1991. "Effect of sodium lactate on microbial and chemical composition of cooked beef during storage". *J. Food Sci.*, 56 (2):341-347.

PAPON, M. y TALON, R. 1988. "Factors affecting growth and lipase production by meat lactobacilli strains and *Brochothrix thermosphacta*". *J. Appl. Bacteriol.*, 64(2):107-115.

PAPON, M. y TALON, R. 1989. "Cell location and partial characterization of *Brochothrix thermosphacta* and *Lactobacillus curvatus* lipases". *J. Appl. Bacteriol.*, 66(3):235-242.

PAULSEN, P.; KORDESCH, M.; SCHOPF, E. y BAUER, F. 1996. "Microbiological methods for the detection of microorganisms forming biogenic amines". En *42th International Congress of Meat Science and Technology*, Lillehammer, Noruega, p 544-545.

PEARCE, K.N. y KINSELLA, J.E. 1978. "Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique". *J. Agric. Food Chem.*, 26 (3):716-722.

PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. y ROSMINI, M.R. 1998. "El color como propiedad física en el control de la calidad de la carne y productos cárnicos". Curso de

posgrado, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional del Litoral (Argentina), p 86.

PÉREZ-CHABELA, M.L.; RODRÍGUEZ-SERRANO, G.M.; LARA-CALDERÓN, P. y GUERRERO, I. 1999. "Microbial spoilage of meats offered for retail sale in Mexico city". *Meat Sci.*, **51**:279-282.

PÉREZ-CHABELA, M.L.; GUERRERO-LEGARRETA, I. y PONCE-ALQUICIRA, E. 2000a. "Estructura del músculo y conversión en carne". En Rosmini, M.R.; Pérez-Álvarez, J.A. y Fernández-López, J. Eds., *Nuevas tendencias en la tecnología e higiene de la industria cárnica*. Universidad Miguel Hernández, Orihuela, España, p 11-21. ISBN 84-95315-47-5.

PÉREZ-CHABELA, M.L.; GUERRERO-LEGARRETA, I. y PONCE-ALQUICIRA, E. 2000b. "Conservación de carnes por aplicación de bacterias lácticas". En Rosmini, M.R.; Pérez-Álvarez, J.A. y Fernández-López, J. Eds., *Nuevas tendencias en la tecnología e higiene de la industria cárnica*. Universidad Miguel Hernández, Orihuela, España, p 119-132. ISBN 84-95315-47-5.

PHILLIPS, C.M. 1981. "Protein conformation at liquid interfaces and its role in stabilizing emulsions and foams". *Food Technol.*, **35**(1):50-57.

PRANDL, O.; FISCHER, A.; SEMIDHOFERT, T. y SINELL, H.J. 1994. "Tecnología e Higiene de la carne". Ed. ACRIBIA S.A. Zaragoza, España, 854 p. ISBN 84-200-0765-X.

QUAGLIA, G.B. y ORBAN, E. 1990. "Influence of enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of Sardine (*Sardina pilchardus*) protein hydrolysates". *J. Food Sci.*, **55**(6):1571-1573, 1619.

QUINTERO-SALAZAR, B. 2001 "Empleo de cultivos bioprotectores y nisina sobre la calidad microbiológica y fisicoquímica de carne de pollo almacenada en condiciones de abuso

de temperatura”. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México D.F, México.

RACCACH, M. 1992. “Some aspects of meat fermentation”. *Food Microbiol.*, **9**(1):55-65.

RICHARDSON, B.C. 1982. “The purification and characterization of a heat-stable protease from *Pseudomonas fluorescens* B52”. *New Zeland Journal of Dairy Science and Technology*, **16**:195-207.

RHEE, K.S. 1992 “Fatty acids in meats and meats products”. En Chow, C.K. Ed. *Fatty acids in foods and their implications*. Marcel Dekker, Nueva York, EUA, p 65-93. ISBN 0-8247-8622.

RODRÍGUEZ, H.R. 1996. “Higiene y sanidad de las carnes de consumo”. Instituto de Tecnología de Alimentos, CICV, INTA, **18**:13-27.

ROIG-SAGUÉS, A. y EEROLA, S. 1997. “Biogenic amines in meat inoculated with *Lactobacillus sake* starter strains and an amine-positive lactic acid bacterium”. *Z. Lebensm Unters Forsch A*, **205**:227-231.

ROOS, R.P.; GALVIN, M.; McAULIFFE, O.; MORGAN, S.M.; RYAN, M.P.; TWOMEY, D.P.; MEANEY, W.J. y HILL, C. 1999. “Developing applications for lactococcal bacteriocins”. *Antonie van Leeuwenhoek*, **76**(1-4):337-346.

ROWAN, N.J. 1999. “Evidence that inimical food-preservation barriers alter microbial resistance, cell morphology and virulence”. *Trends in Food Sci. & Technol.*, **10**:261-270.

SAGARPA. 2002. www.sagarpa.gob.mx/sagar.htm.

SAGE, J.T.; MORIKIS, D. y CHAMPION, P.M. 1991. "Spectroscopic studies of myoglobin at low pH: Heme structure and ligation". *Biochemistry*, **30**(5):1227-1237.

SAMEJIMA, K.; ISHIOROSHI, M. y YASUI, T. 1981. "Relative roles of the head and tail portions of the molecule in heat-induced gelation of myosin". *J. Food Sci.*, **46**(5):1412-1418.

SAMEJIMA, K.; EGELANDSAL, B. y FRETHEIM, K. 1985. "Heat gelation properties and protein extractability of beef myofibrils". *J. Food Sci.*, **50**(6):1540-1543,1555.

SANO, T.; NOGUCHI, S.F.; MATSUMOTO, J.J. y TSUCHIYA, T. 1989. "Role of F-actin in thermal gelation of fish actomyosin". *J. Food Sci.*, **54**(4):800-804.

SANO, T.; NOGUCHI, S.F.; MATSUMOTO, J.J. y TSUCHIYA, T. 1990a. "Thermal gelation characteristics of myosin subfragments". *J. Food Sci.*, **55**(1):55-58, 70.

SANO, T.; NOGUCHI, S.F.; MATSUMOTO, J.J. y TSUCHIYA, T. 1990b. "Effect of ionic strength on dynamic viscoelastic behavior of myosin during thermal gelation". *J. Food Sci.*, **55**(1):58-54, 70.

SANTOS-BUELGA, C.; PEÑA-EGIDO, M J y RIVAS-GONZALO, J.C. 1986. "Changes in tyramine during chorizo-sausage ripening". *J Food Sci.*, **51**(2):518-519.

SAUNDERS, A.B. 1994. "The effect of acidification on myofibrillar proteins". *Meat Sci.*, **37**:271-280.

SCHILLINGER, U.; KAYA, M. y LUCKE, F.-K. 1991. "Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*". *J. Appl. Bacteriol.*, **70**(6):473-478.

SCHOEBITZ, R.; de la VEGA, J.A. y TAMAYO, R. 1990. "Calidad microbiológica y sensorial de la carne de vacuno envasada al vacío almacenada a diferentes temperaturas". *Fleischwirtsch español*, (2):31-36.

SCHWARTZ, W.N. y BIRD, J.W.C. 1977. "Degradation of myofibrillar proteins by cathepsin B and D". *Biochem. J.*, **167**:811-820.

SELGAS, D.; MARÍN, M.L.; PIN, C. y CASAS, C. 1993. "Attachment of bacteria to meat surfaces: A review". *Meat Sci.*, **34**:265-273.

SHELEF, L.A. 1994. "Antimicrobial effects of lactates: A review". *J. Food Prot.*, **57**(5):445-450.

SHEEN, S.J. y SHEEN, V.T. 1988. "Effect of chemical and enzymatic degradation on the functional properties of fraction-1-protein". *J. Agric. Food Chem.*, **36**(3):445-450.

SHIKAMA, K. 1998. "The molecular mechanism of autoxidation for myoglobin and hemoglobin: A venerable puzzle". *Chem. Rev.*, **98**(4):1357-1373.

SILLA-SANTOS, M.H. 1996. "Biogenic amines: their importance in foods". *International J. Food Microbiol.*, **29**:213-231.

SKYTТА, E.; HAIKARA, A. y MATTILA-SANDHOLM, T. 1993. "Production and characterization of antibacterial compounds produced by *Pediococcus damnosus* and *Pediococcus pentosaceus*". *J. Appl. Bacteriol.*, **74**(2):134-142.

SMITH, D.M. y BREKKE, C.J. 1984. "Functional properties of enzymatically modified beef heat protein". *J. Food Sci.*, **49**(6):1525-1528.

SMITH , D.M. y BREKKE, C.J. 1985. "Enzymatic modification of the structure and functional properties of mechanically deboned fowl proteins". *J. Agric. Food Chem.*, **33**(4):631-637.

SMITH, D.M. 1994. "Protein interaction in Gels: Protein-Protein Interactions". En Hettiachchy, N.S. Y Zieglet, G.R. Ed., *Protein functionality in Food Systems*. Marcel Dekker Inc, Nueva York, EUA, p 209-224. ISBN 0-8247-9197-5.

SMULDERS, F.J.M.; BARENDSSEN, P.; van LOGTESTIJN, J.G.; MOSSEL, D.A.A. y van der MAREL, G.M. 1986. "Review: Lactic acid: considerations in favour of its acceptance as a meat decontaminant". *J. Food Technol.*, **21**(4):419-436.

SMYSER, C.F. y SNOEYENBOS, G.H. 1978. "Evaluation of organic acids and other compounds as Salmonella antagonists in meat and bone meat". *Poultry Sci.*, **58**:50-54.

SMYTH, A.B.; SMITH, D.; VEGA-WARNER, V. y O'NEILL, E. 1996. "Thermal denaturation and aggregation of chicken breast muscle myosin and subfragments". *J. Agric. Food Chem.*, **44**(4):1005-1010.

SMYTH, A.B.; SMITH, D.M. y O'NEILL, E. 1998. "Disulfide bonds influence the heat-induced gel properties of chicken breast muscle myosin". *J. Food Sci.*, **63**(4):584-588.

SOLBERG, M. 1970. "The chemistry of color stability in meat - A review". *Can. Inst. Food Technol. J.*, **3**(2):55-62.

STANLEY, D.W.; STONE, A.P. y TUNG, M.A. 1996. "Mechanical properties of food". En Nollet, L.M.L. Ed., *Handbook of Food Analysis. Volumen 1. Physical characterization and nutrient analysis*. Marcel Dekker, Nueva York, EUA, p 93-137.

STEVENS, K.A.; SHELDON, B.W.; KLAPES, N.A. y KLAENHAMMER, T.R. 1991. "Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria". *Appl. Environ. Microbiol.*, **57** (12):3613-3615.

STILES, M.E. 1996. "Biopreservation by lactic acid bacteria". *Antonie van Leeuwenhoek*, **70**:331-345.

SUGIHARA, A.; UESHIMA, M. SHIMADA, Y.; TSUNASAWA, S y TOMINAGA, Y. 1992. "Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Pseudomonas cepacia*". *J. Biochem.*, **112**, 598-603.

TAZAWA, T.; KATO, S.; KATOH, T. y KONNO, K. 2002. "Role of neck region in the thermal agregation of myosin". *J. Agric. Food Chem.*, **50**:196-202.

TOTOSAUS-SÁNCHEZ, A. 1996. "Funcionalidad de extractos proteicos musculares de cabra y res. Efecto de la temperatura y tiempo de almacenamiento". Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México D.F, México.

TOTOSAUS, A.; GUERRERO, I. y LARA, P. 1998. "Functional properties of goat meat proteins". En Whitaker, J.R.; Shahidi, F.; Lopez-Munguia, A.; Yada, R.Y. y Fuller, G. Eds., *Functional properties of proteins and lipids*. American Chemical Society, Washington, DC., EUA, p 218-227. ISBN 0-8412-3584-8.

TROUT, G.R. 1989. "Variation in myoglobin denaturation and color of cooked beef, pork, and turkey meat as influenced by pH, sodium chloride, sodium tripolyphosphate, and cooking temperature". *J. Food Sci.*, **54**(3):536-540,544.

UNDA, J.R.; MOLINS, R.A. y WALKER, H.W. 1990. "Microbiological and some physical and chemical changes in vacuum-packaged beef steaks treated with combinations of

potassium sorbate, phosphate, sodium chloride and sodium acetate". *J. Food Sci.*, **55** (2):323-326.

UTENG, M.; HAUGE, H.H.; BRONDZ, I.; NISSEN-MEYER, J. y FIMLAND, G. 2002. "Rapid two-step procedure for large-scale purification of pediocin-like bacteriocins and other cationic antimicrobial peptides from complex culture medium". *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**(2):952-956.

Van der MAREL, G.M.; van LOGTESTIJN, J.G. y MOSSEL, D.A.A. 1988. "Bacteriological quality of broiler carcasses as affected by in-plant lactic acid decontamination". *Int. J. Food Microbiol.*, **6**(1):31-42.

Van NETTEN, P.; HUIS, J.H.J.; VELD, H. y MOSSEL, D.A.A. 1994. "The immediate bactericidal effect of lactic acid on meat-borne pathogens". *J. Appl. Bacteriol.*, **77**(5):490-496.

Van VLIET, T. 1999. "Rheological Classification of foods and instrumental techniques for their study". En Rosenthal, A.J. Ed., *Food Texture*. Aspen Publications, Maryland, EUA, p 65-98. ISBN 0-8342-1238-2.

VEGA, L.; BRUCE, J.; CRAWFORD, S. y HUMPHESON, L. 1998. "The use of organic acids as potential inhibitors of bacterial growth in minced beef". En *Proceeding 44th Annual International Congress of Meat Science and Technology*, Barcelona, España, vol. I, p 318-319.

VEGA-WARNER, V.; MERKEL, R.A. y SMITH, D.M. 1999. "Composition, solubility and gel properties of salt soluble proteins from two bovine muscle types". *Meat Sci.*, **51**:197-203.

VEGA-WARNER, V. y SMITH, D.M. 2001. "Denaturation and aggregation of myosin from two bovine muscle types". *J. Agric Food Chem.*, **49**:906-912.

VERHEUL, AN.; RUSSELL, N.J.; VAN'T HOF, R.; ROMBOUST, F.M. y ABEE, T. 1997. "Modifications of membrane phospholipid composition in nisin-resistant *Listeria monocytogenes* Scott A". Appl. Environ. Microbiol., **63** (9):3451-3457.

VISSANGUAN, W. y AN, H. 2000. "Effects of proteolysis and mechanism of gel weakening in heat-induced gelation of fish myosin", J. Agric. Food Chem., **48**(4):1024-1032.

VISSANGUAN, W.; OGAWA, M.; NAKAI, S. y AN, H. 2000. "Physicochemical changes and mechanism of heat-induced gelation of Arrowtooth flounder myosin". J. Agric. Food Chem., **48**(1):1016-1023.

VOJDANI, F. 1996. "Solubility". En Hall, G.M Ed., *Methods of Testing Protein Functionality*. 1^{ra}. Edición. Blackie Academic & Professional, Londres, Inglaterra, p 11-60. ISBN 0 7514 0053 X.

VOUSINAS, L.P.; CHEUNG, E. y NAKAI, S. 1983. "Relationships of hydrophobicity to emulsifying properties of heat denatured proteins". J. Food Sci., **48**(1):26-32.

WANG, B. y XIONG, Y.L. 1998. "Evidence of proteolytic activity and its effect on gelation of myofibrillar protein concentrate from bovine cardiac muscle". J. Agric. Food Chem., **46**(8):3054-3059.

WING, L. P.; YADA, R.Y. y SKURA, B J 1983. "Electron microscopic investigation of *Pseudomonas fragi* ATCC 4973 on intact and sarcoplasm-depleted bovine *Longissimus dorsi* muscle at 21 °C". J. Food Sci., **48**(2):475-477, 500

WINKOWSKI, K.; CRANDALL, A.D. y MONTVILLE, T.J. 1993. "Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus bavaricus* MN in beef systems at refrigeration temperatures". Appl. Environ. Microbiol., **59** (8):2552-2557.

WISMER-PEDERSEN, J. 1994. "Química de los tejidos animales" En Prandl, O.; Fishcer, A.; Scmidhofert, T. y Sinell, H.J. Ed., *Tecnología e Higiene de la Carne*. Ed. Acribia, Zaragoza, España, p 125-138.

WU, F.Y. y SMITH, S.B. 1987. "Ionic strength and myofibrillar protein solubilization". *J. Anim. Sci.*, **65**(2):597-608.

XIONG, Y.L. 1992. "Thermally induced interactions and gelation of combined myofibrillar protein from white and red broiler muscles". *J. Food Sci.*, **57**(3):581-585.

XIONG, Y.L. 1994. "Myofibrillar protein from different muscle fiber types: Implications of biochemical and functional properties in meat processing". *Crt. Rev. Food Sci. and Nut.*, **34**(3):293-320.

XIONG, Y.L. y BLANCHARD, S.P. 1994. "Myofibrillar protein gelation: Viscoelastic changes related to heating procedures". *J. Food Sci.*, **59**(4):734-738.

YAMAUCHI, K.; SHIMIZU, M. y KAMIYA, T. 1980. "Emulsifying properties of whey protein". *J. Food Sci.*, **45**(5):1237-1242.

YIN, M.C. y FAUSTMAN, C. 1993. "Influence of temperature, pH and phospholipid composition upon the stability of myoglobin and phospholipid: A liposome model". *J. Food Sci.*, **41**(6):853-857.

YOUNG, K.M. y FOEGEDING, P.M. 1993. "Acetic, lactic and citric acids and pH inhibition of *Listeria monocytogenes* Scott A and the effect on intracelular pH". *J. Appl. Bacteriol.*, **74**(5):515-520.

YOUNG LEE, S. y SHICK RHEE, J. 1993. "Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK". *Enzyme Microb. Technol.*, **15**:617-623.

ANEXO 1
ANÁLISIS
ESTADÍSTICOS

9. Anexo 1: Análisis estadísticos

Tabla 6: Crecimiento de bacterias mesófilas totales.

Bacterias mesófilas totales	p >	Prueba de Duncan (*)	
Almacenamiento a 4 °C n = 180			
Inóculo gl 4	0.001	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	6.58 b
		<i>L. pentosus</i>	7.07 a
		<i>S. carnosus</i>	6.52 b
		Ácido láctico	5.67 c
		Control	6.53 b
Tiempo gl 3	0.001	Tiempo (días)	Media
		0	5.51 c
		4	6.54 b
		8	6.92 a
		12	6.92 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.084		
Almacenamiento a 20 °C n = 180			
Inóculo gl 4	0.001	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	7.37 a
		<i>L. pentosus</i>	7.25 a
		<i>S. carnosus</i>	7.13 ab
		Ácido láctico	6.45 c
		Control	6.81 b
Tiempo gl 3	0.001	Tiempo (días)	Media
		0	5.40 c
		2	7.12 b
		4	7.60 a
		6	7.87 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.622		

(*) Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 7: Crecimiento de bacterias lácticas.

Bacterias lácticas	p >	Prueba de Duncan (*)	
Almacenamiento a 4 °C n = 180			
Inóculo gl 4	0.001	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	6.78 a
		<i>L. pentosus</i>	7.00 a
		<i>S. carnosus</i>	6.48 b
		Ácido láctico	5.72 d
		Control	6.15 c
Tiempo gl 3	0.001	Tiempo (días)	Media
		0	5.34 d
		4	6.36 c
		8	6.88 b
		12	7.14 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.245		
Almacenamiento a 20 °C n = 180			
Inóculo gl 4	0.001	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	7.45 a
		<i>L. pentosus</i>	7.29 a
		<i>S. carnosus</i>	7.13 a
		Ácido láctico	6.63 b
		Control	6.76 b
Tiempo gl 3	0.001	Tiempo (días)	Media
		0	5.29 c
		2	7.16 b
		4	7.75 a
		6	8.01 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.662		

(*) Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 8: Crecimiento de enterobacterias.

Enterobacterias	p >	Prueba de Duncan (*)	
Almacenamiento a 4 °C n = 180			
Inóculo gl 4	0.001	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	4.54 b
		<i>L. pentosus</i>	4.43 b
		<i>S. carnosus</i>	4.79 ab
		Ácido láctico	3.91 c
		Control	5.03 a
Tiempo gl 3	0.001	Tiempo (días)	Media
		0	3.36 c
		4	4.61 b
		8	5.04 a
		12	5.15 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.813	..	
Almacenamiento a 20 °C n = 180			
Inóculo gl 4	0.001	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	5.27 b
		<i>L. pentosus</i>	5.21 b
		<i>S. carnosus</i>	5.45 ab
		Ácido láctico	4.47 c
		Control	5.68 a
Tiempo gl 3	0.001	Tiempo (días)	Media
		0	3.33 d
		2	5.46 c
		4	5.84 b
		6	6.23 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.767		

(*) Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 9: Crecimiento de *Pseudomonas* spp.

<i>Pseudomonas</i> spp.	p >	Prueba de Duncan (*)	
Almacenamiento a 4 °C n = 60			
Inóculo gl 4	0.176	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	3.83 ab
		<i>L. pentosus</i>	3.88 ab
		<i>S. carnosus</i>	4.15 a
		Ácido láctico	3.07 a
		Control	4.14 a
Tiempo gl 3	0.913	Tiempo (días)	Media
		0	3.63 a
		4	3.84 a
		8	3.90 a
		12	3.89 a
Inóculo X Tiempo gl 12	1.00		
Almacenamiento a 20 °C n = 60			
Inóculo gl 4	0.002	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	4.28 b
		<i>L. pentosus</i>	4.33 b
		<i>S. carnosus</i>	4.21 b
		Ácido láctico	3.46 c
		Control	5.01 a
Tiempo gl 3	0.001	Tiempo (días)	Media
		0	3.48 b
		2	4.33 a
		4	4.42 a
		6	4.80 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.832		

(*) Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 10: Crecimiento de *Brochothrix thermosphacta*.

<i>Brochothrix thermosphacta</i>	p >	Prueba de Duncan (*)	
Almacenamiento a 4 °C			
n = 60			
Inóculo gl 4	0.113	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	4.17 ab
		<i>L. pentosus</i>	3.77 ab
		<i>S. carnosus</i>	4.09 ab
		Ácido láctico	3.45 b
		Control	4.61 a
Tiempo gl 3	0.355	Tiempo (días)	Media
		0	3.86 a
		4	4.40 a
		8	4.07 a
		12	3.74 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.850		
Almacenamiento a 20 °C			
n = 60			
Inóculo gl 4	0.141	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	3.92 ab
		<i>L. pentosus</i>	3.89 ab
		<i>S. carnosus</i>	3.88 ab
		Acido láctico	3.20 b
		Control	4.39 a
Tiempo gl 3	0.850	Tiempo (días)	Media
		0	3.80 a
		2	3.76 a
		4	3.78 a
		6	4.07 a
Inóculo X Tiempo gl 12	1.000		

(*) Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 11: Crecimiento de bacterias lácticas heterofermentativas.

Bacterias lácticas heterofermentativas	p >	Prueba de Duncan (*)	
Almacenamiento a 4 °C n = 60			
Inóculo gl 4	0.001	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	4.92 a
		<i>L. pentosus</i>	4.63 ab
		<i>S. carnosus</i>	4.60 ab
		Ácido láctico	3.60 c
		Control	4.18 b
Tiempo gl 3	0.001	Tiempo (días)	Media
		0	3.01 d
		4	4.33 c
		8	4.85 b
		12	5.36 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.312		
Almacenamiento a 20 °C n = 60			
Inóculo gl 4	0.001	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	5.53 b
		<i>L. pentosus</i>	5.19 c
		<i>S. carnosus</i>	5.48 b
		Ácido láctico	5.11 c
		Control	5.79 a
Tiempo gl 3	0.001	Tiempo (días)	Media
		0	3.01 c
		2	5.97 b
		4	6.27 a
		6	6.44 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.312		

(*) Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 12: pH cárnico.

pH	p >	Prueba de Duncan (*)	
Almacenamiento a 4 °C n = 179			
Inóculo gl 4	0.001	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	5.25 b
		<i>L. pentosus</i>	5.25 b
		<i>S. carnosus</i>	5.37 a
		Ácido láctico	4.87 c
		Control	5.36 a
Tiempo gl 3	0.001	Tiempo (días)	Media
		0	5.46 a
		4	5.21 b
		8	5.11 c
		12	5.10 c
Inóculo X Tiempo gl 12	0.032	.	
Almacenamiento a 20 °C n = 180			
Inóculo gl 4	0.001	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	5.26 a
		<i>L. pentosus</i>	5.30 a
		<i>S. carnosus</i>	5.32 a
		Ácido láctico	4.82 b
		Control	5.34 a
Tiempo gl 3	0.001	Tiempo (días)	Media
		0	5.47 a
		2	4.91 d
		4	5.12 c
		6	5.32 b
Inóculo X Tiempo gl 12	0.937		

(*) Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 13: Concentración de ácido palmítico.

Ácido palmítico	p >	Prueba de Duncan (*)	
Almacenamiento a 4 °C n = 60			
Inóculo gl 4	0.050	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	2.18 b
		<i>L. pentosus</i>	2.27 b
		<i>S. carnosus</i>	2.17 b
		Ácido láctico	2.17 b
		Control	2.66 a
Tiempo gl 3	0.919	Tiempo (días)	Media
		0	2.30 a
		4	2.28 a
		8	2.35 a
		12	2.24 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.553		
Almacenamiento a 20 °C n = 60			
Inóculo gl 4	0.474	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	2.14 a
		<i>L. pentosus</i>	2.32 a
		<i>S. carnosus</i>	2.27 a
		Acido láctico	2.32 a
		Control	2.44 a
Tiempo gl 3	0.965	Tiempo (días)	Media
		0	2.30 a
		2	2.34 a
		4	2.29 a
		6	2.27 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.990		

(*) Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 14: Concentración de ácido oléico.

Ácido oléico	p >	Prueba de Duncan (*)	
Almacenamiento a 4 °C n = 60			
Inóculo gl 4	0.282	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	5.78 a
		<i>L. pentosus</i>	5.96 a
		<i>S. carnosus</i>	5.72 a
		Ácido láctico	5.69 a
		Control	6.62 a
Tiempo gl 3	0.910	Tiempo (días)	Media
		0	6.05 a
		4	5.99 a
		8	6.01 a
		12	5.76 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.937		
Almacenamiento a 20 °C n = 60			
Inóculo gl 4	0.668	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	5.65 a
		<i>L. pentosus</i>	6.00 a
		<i>S. carnosus</i>	5.78 a
		Ácido láctico	5.92 a
		Control	6.29 a
Tiempo gl 3	0.894	Tiempo (días)	Media
		0	6.05 a
		2	6.01 a
		4	5.89 a
		6	5.77 a
Inóculo X Tiempo gl 12	1.000		

(*) Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 15: Concentración de ácido esteárico.

Ácido esteárico	p >	Prueba de Duncan (*)	
Almacenamiento a 4 °C n = 60			
Inóculo gl 4	0.106	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	1.89 b
		<i>L. pentosus</i>	1.94 b
		<i>S. carnosus</i>	1.90 b
		Ácido láctico	1.92 b
		Control	2.27 a
Tiempo gl 3	0.635	Tiempo (días)	Media
		0	2.09 a
		4	1.97 a
		8	1.97 a
		12	1.91 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.876		
Almacenamiento a 20 °C n = 60			
Inóculo gl 4	0.832	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	1.88 a
		<i>L. pentosus</i>	2.02 a
		<i>S. carnosus</i>	1.98 a
		Ácido láctico	2.03 a
		Control	2.03 a
Tiempo gl 3	0.512	Tiempo (días)	Media
		0	2.09 a
		2	1.97 a
		4	1.99 a
		6	1.90 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.998		

(*) Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 16: Concentración de histamina.

Histamina	p >	Prueba de Duncan (*)	
Almacenamiento a 4 °C n = 180			
Inóculo gl 4	0.722	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	2.84 a
		<i>L. pentosus</i>	4.19 a
		<i>S. carnosus</i>	3.07 a
		Ácido láctico	2.39 a
		Control	7.09 a
Tiempo gl 3	0.076	Tiempo (días)	Media
		0	0.00 b
		4	4.18 ab
		8	2.87 ab
		12	8.62 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.994		
Almacenamiento a 20 °C n = 180			
Inóculo gl 4	0.001	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	0.00 b
		<i>L. pentosus</i>	0.24 b
		<i>S. carnosus</i>	0.05 b
		Acido láctico	0.09 b
		Control	4.91 a
Tiempo gl 3	0.001	Tiempo (días)	Media
		0	0.00 b
		2	0.11 b
		4	0.19 b
		6	3.93 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.000		

(*) Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 17: Concentración de tiramina.

Tiramina	p >	Prueba de Duncan (*)	
Almacenamiento a 4 °C n = 180			
Inóculo gl 4	0.262	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	92.75 a
		<i>L. pentosus</i>	127.36 a
		<i>S. carnosus</i>	138.73 a
		Ácido láctico	99.01 a
		Control	99.21 a
Tiempo gl 3	0.001	Tiempo (días)	Media
		0	14.24 b
		4	159.05 a
		8	154.44 a
		12	117.92 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.913		
Almacenamiento a 20 °C n = 180			
Inóculo gl 4	0.164	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	137.28 ab
		<i>L. pentosus</i>	132.11 ab
		<i>S. carnosus</i>	114.35 ab
		Ácido láctico	78.69 b
		Control	145.78 a
Tiempo gl 3	0.001	Tiempo (días)	Media
		0	14.39 b
		2	139.28 a
		4	151.14 a
		6	181.76 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.997		

(*) Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 18: Concentración de putrescina.

Putrescina	p >	Prueba de Duncan (*)	
Almacenamiento a 4 °C n = 180			
Inóculo gl 4	0.065	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	52.94 a
		<i>L. pentosus</i>	58.95 a
		<i>S. carnosus</i>	48.73 ab
		Ácido láctico	33.62 b
		Control	54.78 a
Tiempo gl 3	0.001	Tiempo (días)	Media
		0	8.88 d
		4	34.71 c
		8	61.37 b
		12	94.26 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.714		
Almacenamiento a 20 °C n = 180			
Inóculo gl 4	0.270	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	195.60 ab
		<i>L. pentosus</i>	202.09 ab
		<i>S. carnosus</i>	214.67 ab
		Ácido láctico	124.26 b
		Control	245.68 a
Tiempo gl 3	0.001	Tiempo (días)	Media
		0	5.00 c
		2	93.74 c
		4	191.34 b
		6	495.77 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.456		

(*) Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 19: Concentración de cadaverina.

Cadaverina	p >	Prueba de Duncan (*)	
<p>Almacenamiento a 4 °C n = 180</p> <p>Inóculo gl 4</p> <p>Tiempo gl 3</p> <p>Inóculo X Tiempo gl 12</p>	<p>0.977</p> <p>0.070</p> <p>0.998</p>	<p>Tratamiento</p> <p>Media</p> <p><i>L. carnis</i> 13.97 a</p> <p><i>L. pentosus</i> 13.06 a</p> <p><i>S. carnosus</i> 14.88 a</p> <p>Ácido láctico 14.71 a</p> <p>Control 15.29 a</p> <p>Tiempo (días)</p> <p>Media</p> <p>0 11.28 b</p> <p>4 12.17 b</p> <p>8 14.81 ab</p> <p>12 19.28 a</p>	
<p>Almacenamiento a 20 °C n = 180</p> <p>Inóculo gl 4</p> <p>Tiempo gl 3</p> <p>Inóculo X Tiempo gl 12</p>	<p>0.657</p> <p>0.001</p> <p>0.929</p>	<p>Tratamiento</p> <p>Media</p> <p><i>L. carnis</i> 51.80 a</p> <p><i>L. pentosus</i> 53.80 a</p> <p><i>S. carnosus</i> 60.11 a</p> <p>Ácido láctico 39.04 a</p> <p>Control 57.91 a</p> <p>Tiempo (días)</p> <p>Media</p> <p>0 10.79 c</p> <p>2 20.23 c</p> <p>4 55.35 b</p> <p>6 123.75 a</p>	

(*) Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 20: Concentración de la cadena pesada de miosina.

Miosina	p >	Prueba de Duncan (*)	
Almacenamiento a 4 °C n = 180			
Inóculo gl 4	0.345	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	29.02 a
		<i>L. pentosus</i>	28.41 a
		<i>S. carnosus</i>	27.69 a
		Ácido láctico	27.59 a
		Control	27.42 a
Tiempo gl 3	0.003	Tiempo (días)	Media
		0	28.47 ab
		4	29.57 a
		8	27.07 b
		12	27.00 b
Inóculo X Tiempo gl 12	0.844		
Almacenamiento a 20 °C n = 180			
Inóculo gl 4	0.001	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	24.24 a
		<i>L. pentosus</i>	23.41 a
		<i>S. carnosus</i>	25.18 a
		Ácido láctico	20.47 b
		Control	24.03 a
Tiempo gl 3	0.001	Tiempo (días)	Media
		0	29.55 a
		2	25.27 b
		4	20.60 c
		6	18.43 d
Inóculo X Tiempo gl 12	0.387		

(*) Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 21: Concentración de actina.

Actina	p >	Prueba de Duncan (*)	
Almacenamiento a 4 °C n = 180			
Inóculo gl 4	0.213	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	23.29 a
		<i>L. pentosus</i>	23.70 a
		<i>S. carnosus</i>	24.43 a
		Ácido láctico	23.44 a
		Control	23.41 a
Tiempo gl 3	0.443	Tiempo (días)	Media
		0	23.60 a
		4	24.03 a
		8	23.73 a
		12	23.26 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.910		
Almacenamiento a 20 °C n = 180			
Inóculo gl 4	0.912	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	22.12 a
		<i>L. pentosus</i>	21.93 a
		<i>S. carnosus</i>	22.23 a
		Ácido láctico	22.52 a
		Control	22.56 a
Tiempo gl 3	0.003	Tiempo (días)	Media
		0	23.41 a
		2	22.40 a
		4	22.40 a
		6	20.88 b
Inóculo X Tiempo gl 12	0.976		

(*) Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 22: Porcentaje de solubilidad.

Solubilidad	p >	Prueba de Duncan (*)	
Almacenamiento a 4 °C n = 179			
Inóculo gl 4	0.006	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	34.24 a
		<i>L. pentosus</i>	34.52 a
		<i>S. carnosus</i>	34.85 a
		Ácido láctico	29.07 b
		Control	34.74 a
Tiempo gl 3	0.026	Tiempo (días)	Media
		0	32.92 ab
		4	36.21 a
		8	33.44 ab
		12	31.41 b
Inóculo X Tiempo gl 12	0.879	.	.
Almacenamiento a 20 °C n = 180			
Inóculo gl 4	0.872	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	27.96 a
		<i>L. pentosus</i>	27.94 a
		<i>S. carnosus</i>	28.77 a
		Ácido láctico	27.07 a
		Control	28.80 a
Tiempo gl 3	0.001	Tiempo (días)	Media
		0	32.80 a
		2	26.31 bc
		4	28.72 b
		6	24.59 c
Inóculo X Tiempo gl 12	0.569	.	.

(*) Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05 .

Tabla 23: Concentración de grupos SH libres.

Grupos SH	p >	Prueba de Duncan (*)	
Almacenamiento a 4 °C n = 179			
Inóculo gl 4	0.864	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	64.32 a
		<i>L. pentosus</i>	63.63 a
		<i>S. carnosus</i>	66.05 a
		Ácido láctico	65.75 a
		Control	66.59 a
Tiempo gl 3	0.002	Tiempo (días)	Media
		0	69.02 a
		4	65.85 a
		8	58.81 b
		12	67.42 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.998		
Almacenamiento a 20 °C n = 180			
Inóculo gl 4	0.853	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	50.52 a
		<i>L. pentosus</i>	64.00 a
		<i>S. carnosus</i>	62.74 a
		Ácido láctico	64.11 a
		Control	63.76 a
Tiempo gl 3	0.075	Tiempo (días)	Media
		0	66.61 a
		2	58.12 b
		4	63.59 ab
		6	63.78 ab
Inóculo X Tiempo gl 12	0.992		

(*) Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 24: Fuerza de penetración de geles.

Penetración de geles	p >	Prueba de Duncan (*)	
Almacenamiento a 4 °C n = 179			
Inóculo gl 4	0.001	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	0.83 a
		<i>L. pentosus</i>	0.81 a
		<i>S. carnosus</i>	0.92 a
		Ácido láctico	0.48 b
		Control	0.89 a
Tiempo gl 3	0.001	Tiempo (días)	Media
		0	1.07 a
		4	0.88 b
		8	0.58 c
		12	0.61 c
Inóculo X Tiempo gl 12	0.045		
Almacenamiento a 20 °C n = 180			
Inóculo gl 4	0.001	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	0.52 a
		<i>L. pentosus</i>	0.40 b
		<i>S. carnosus</i>	0.46 ab
		Ácido láctico	0.19 c
		Control	0.45 ab
Tiempo gl 3	0.001	Tiempo (días)	Media
		0	1.05 a.
		2	0.25 b
		4	0.16 b
		6	0.15 b
Inóculo X Tiempo gl 12	0.003		

(*) Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 25: Módulo de almacenamiento (G').

Módulo de almacenamiento	p >	Prueba de Duncan (*)	
Almacenamiento a 4 °C n = 60			
Inóculo gl 4	0.001	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	18.18 a
		<i>L. pentosus</i>	19.63 a
		<i>S. carnosus</i>	17.89 a
		Ácido láctico	5.94 b
		Control	15.22 a
Tiempo gl 3	0.001	Tiempo (días)	Media
		0	29.53 a
		4	17.06 b
		8	7.42 c
		12	7.47 c
Inóculo X Tiempo gl 12	0.566		
Almacenamiento a 20 °C n = 60			
Inóculo gl 4	0.002	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	19.27 a
		<i>L. pentosus</i>	21.87 a
		<i>S. carnosus</i>	19.20 a
		Ácido láctico	5.69 b
		Control	14.74 a
Tiempo gl 3	0.001	Tiempo (días)	Media
		0	29.53 a
		2	15.02 b
		4	13.13 bc
		6	6.76 c
Inóculo X Tiempo gl 12	0.994		

(*) Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 26: Tan δ .

Tan δ	p >	Prueba de Duncan (*)	
Almacenamiento a 4 °C n = 60			
Inóculo gl 4	0.848	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	4.45 a
		<i>L. pentosus</i>	4.28 a
		<i>S. carnosus</i>	5.46 a
		Ácido láctico	4.33 a
		Control	4.46 a
Tiempo gl 3	0.389	Tiempo (días)	Media
		0	4.10 a
		4	4.47 a
		8	4.12 a
		12	5.71 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.404		
Almacenamiento a 20 °C n = 60			
Inóculo gl 4	0.001	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	3.93 b
		<i>L. pentosus</i>	3.52 b
		<i>S. carnosus</i>	3.68 b
		Ácido láctico	5.55 a
		Control	3.93 b
Tiempo gl 3	0.069	Tiempo (días)	Media
		0	4.10 ab
		2	3.76 b
		4	3.89 b
		6	4.74 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.004		

(*) Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 27: Índice de Actividad de Emulsión.

IAE	p >	Prueba de Duncan (*)	
Almacenamiento a 4 °C n = 179			
Inóculo gl 4	0.897	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	2.23 a
		<i>L. pentosus</i>	2.21 a
		<i>S. carnosus</i>	2.19 a
		Ácido láctico	2.14 a
		Control	2.17 a
Tiempo gl 3	0.001	Tiempo (días)	Media
		0	2.12 bc
		4	2.26 b
		8	2.02 c
		12	2.36 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.828	.	.
Almacenamiento a 20 °C n = 180			
Inóculo gl 4	0.111	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	1.78 a
		<i>L. pentosus</i>	2.04 b
		<i>S. carnosus</i>	1.94 ab
		Ácido láctico	1.99 ab
		Control	2.06 a
Tiempo gl 3	0.009	Tiempo (días)	Media
		0	2.12 a
		2	1.78 b
		4	2.03 a
		6	1.91 ab
Inóculo X Tiempo gl 12	0.377	.	.

(*) Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 28: Índice de Estabilidad de Emulsión.

IEE	p >	Prueba de Duncan (*)	
Almacenamiento a 4 °C n = 179			
Inóculo gl 4	0.550	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	48.56 a
		<i>L. pentosus</i>	49.63 a
		<i>S. carnosus</i>	52.20 a
		Ácido láctico	48.99 a
		Control	50.20 a
Tiempo gl 3	0.111	Tiempo (días)	Media
		0	48.97 ab
		4	47.97 b
		8	50.16 ab
		12	52.66 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.917		
Almacenamiento a 20 °C n = 180			
Inóculo gl 4	0.508	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	49.22 a
		<i>L. pentosus</i>	44.96 a
		<i>S. carnosus</i>	47.21 a
		Ácido láctico	45.36 a
		Control	47.18 a
Tiempo gl 3	0.037	Tiempo (días)	Media
		0	50.24 a
		2	47.77 ab
		4	45.47 ab
		6	43.67 b
Inóculo X Tiempo gl 12	0.909		

(*) Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 29: Capacidad de Emulsión.

CE	p >	Prueba de Duncan (*)	
Almacenamiento a 4 °C n = 180			
Inóculo gl 4	0.001	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	49.07 bc
		<i>L. pentosus</i>	44.31 c
		<i>S. carnosus</i>	58.84 ab
		Ácido láctico	44.44 c
		Control	62.92 a
Tiempo gl 3	0.665	Tiempo (días)	Media
		0	50.95 a
		4	54.98 a
		8	49.59 a
		12	52.15 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.275		
Almacenamiento a 20 °C n = 180			
Inóculo gl 4	0.101	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	44.23 a
		<i>L. pentosus</i>	37.27 a
		<i>S. carnosus</i>	44.19 a
		Ácido láctico	34.70 a
		Control	36.62 a
Tiempo gl 3	0.001	Tiempo (días)	Media
		0	49.45 a
		2	35.53 b
		4	35.92 b
		6	36.71 b
Inóculo X Tiempo gl 12	0.603		

(*) Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 30: Luminosidad.

Luminosidad	p >	Prueba de Duncan (*)	
Almacenamiento a 4 °C n = 179			
Inóculo gl 4	0.007	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	49.48 b
		<i>L. pentosus</i>	49.78 b
		<i>S. carnosus</i>	49.79 b
		Ácido láctico	51.09 a
		Control	48.77 b
Tiempo gl 3	0.017	Tiempo (días)	Media
		0	48.88 b
		4	49.54 ab
		8	50.18 a
		12	50.52 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.827		
Almacenamiento a 20 °C n = 180			
Inóculo gl 4	0.246	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	51.06 ab
		<i>L. pentosus</i>	51.33 ab
		<i>S. carnosus</i>	51.04 ab
		Ácido láctico	52.28 a
		Control	50.57 b
Tiempo gl 3	0.001	Tiempo (días)	Media
		0	49.11 b
		2	51.87 a
		4	52.10 a
		6	51.94 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.498		

(*) Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 31: Cromaticidad.

Croma	p >	Prueba de Duncan (*)	
Almacenamiento a 4 °C n = 178			
Inóculo gl 4	0.423	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	20.77 a
		<i>L. pentosus</i>	20.49 a
		<i>S. carnosus</i>	20.69 a
		Ácido láctico	20.49 a
		Control	20.23 a
Tiempo gl 3	0.031	Tiempo (días)	Media
		0	20.94 a
		4	20.45 ab
		8	20.60 ab
		12	20.14 b
Inóculo X Tiempo gl 12	0.042	.	.
Almacenamiento a 20 °C n = 180			
Inóculo gl 4	0.428	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	19.73 a
		<i>L. pentosus</i>	19.49 a
		<i>S. carnosus</i>	19.16 a
		Ácido láctico	19.46 a
		Control	19.42 a
Tiempo gl 3	0.001	Tiempo (días)	Media
		0	21.37 a
		2	19.96 b
		4	18.31 c
		6	18.17 c
Inóculo X Tiempo gl 12	0.695	.	.

(*) Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 32: Tonalidad

Tono	p >	Prueba de Duncan (*)	
Almacenamiento a 4 °C n = 178			
Inóculo gl 4	0.001	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	63.80 b
		<i>L. pentosus</i>	64.76 b
		<i>S. carnosus</i>	64.02 b
		Ácido láctico	66.27 a
		Control	63.31 b
Tiempo gl 3	0.001	Tiempo (días)	Media
		0	62.64 b
		4	64.44 a
		8	64.83 a
		12	65.76 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.008		
Almacenamiento a 20 °C n = 180			
Inóculo gl 4	0.159	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	68.11 a
		<i>L. pentosus</i>	69.12 a
		<i>S. carnosus</i>	69.26 a
		Ácido láctico	69.97 a
		Control	68.06 a
Tiempo gl 3	0.001	Tiempo (días)	Media
		0	62.79 c
		2	67.80 b
		4	72.16 a
		6	72.86 a
Inóculo X Tiempo gl 12	0.080		

(*) Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 33: Índice de Decoloración.

Índice de decoloración	p >	Prueba de Duncan (*)	
Almacenamiento a 4 °C			
n = 178			
Inóculo gl 4	0.001	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	24.41 a
		<i>L. pentosus</i>	24.54 a
		<i>S. carnosus</i>	25.05 a
		Ácido láctico	20.76 b
		Control	25.21 a
Tiempo gl 3	0.130	Tiempo (días)	Media
		0	23.57 b
		4	23.79 ab
		8	24.65 a
		12	24.10 ab
Inóculo X Tiempo gl 12	0.010		
Almacenamiento a 20 °C			
n = 180			
Inóculo gl 4	0.001	Tratamiento	Media
		<i>L. carnis</i>	24.05 a
		<i>L. pentosus</i>	22.75 a
		<i>S. carnosus</i>	23.03 a
		Ácido láctico	19.27 b
		Control	23.82 a
Tiempo gl 3	0.001	Tiempo (días)	Media
		0	23.92 a
		2	23.74 a
		4	21.40 b
		6	21.28 b
Inóculo X Tiempo gl 12	0.543		

(*) Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 34: Análisis de correlación entre parámetros relacionados con la gelificación.

Parámetros de Gelificación				
Almacenamiento a 4 °C				
		T. penetración	G'	G''/G' (δ)
pH	r	0.478	0.465	0.208
	p >	0.001	0.001	0.110
	n	179	60	60
Solubilidad	r	0.228	0.195	- 0.103
	p >	0.002	0.135	- 0.435
	n	179	60	- 60
Miosina	r	0.117	0.135	- 0.015
	p >	0.120	0.302	- 0.908
	n	179	60	- 60
Actina	r	0.117	0.099	0.117
	p >	0.119	0.451	0.375
	n	179	60	60
T. penetración	r	1.000	0.683	- 0.043
	p >		0.001	0.744
	n	179	60	60
Almacenamiento a 20 °C				
		T. penetración	G'	G''/G' (δ)
pH	r	0.476	0.399	- 0.215
	p >	0.001	0.002	0.099
	n	180	60	60
Solubilidad	r	0.320	0.394	- 0.250
	p >	0.001	0.002	0.054
	n	180	60	60
Miosina	r	0.601	0.582	- 0.528
	p >	0.001	0.001	0.001
	n	180	60	60
-Actina	r	0.283	0.157	0.187
	p >	0.001	0.230	0.152
	n	180	60	60
T. penetración	r	1.000	0.672	0.0075
	p >		0.001	0.569
	n	180	60	60

Tabla 35: Análisis de correlación entre parámetros relacionados con la emulsificación.

		Parámetros de Emulsificación		
		Almacenamiento a 4 °C		
		IAE	IEE	CE
pH	r	- 0.05	0.017	0.058
	p >	0.943	0.826	0.442
	n	179	179	179
-SH	r	0.308	- 0.145	- 0.111
	p >	0.001	0.054	0.141
	n	179	179	179
Solubilidad	r	0.064	0.081	0.141
	p >	0.396	0.280	0.060
	n	179	179	179
Miosina	r	0.046	- 0.220	- 0.270
	p >	0.539	0.003	0.002
	n	179	179	179
Actina	r	-0.066	- 0.137	- 0.357
	p >	0.383	0.068	0.001
	n	179	179	179
		Almacenamiento a 20 °C		
		IAE	IEE	CE
pH	r	0.265	0.001	0.111
	p >	0.001	0.985	0.139
	n	180	180	180
-SH	r	0.254	- 0.133	- 0.247
	p >	0.001	0.076	0.001
	n	180	180	180
Solubilidad	r	- 0.034	0.195	0.390
	p >	0.652	0.009	0.001
	n	180	180	180
Miosina	r	0.173	0.051	0.092
	p >	0.021	0.493	0.217
	n	180	180	180
Actina	r	0.075	- 0.058	- 0.327
	p >	0.316	0.985	0.001
	n	180	180	180

Tabla 36: Análisis de correlación entre parámetros relacionados con el color.

Parámetros de Color					
Almacenamiento 4 °C					
		L*	I.D	Croma	Tono
pH	r	- 0.535	0.479	0.025	- 0.406
	p >	0.001	0.001	0.741	0.001
	n	179	178	178	178
L*	r	1.000	- 0.600	- 0.180	0.700
	p >		0.001	0.016	0.001
	n	179	178	178	178
I.D	r	0.600	1.000	0.284	- 0.606
	p >	0.001		0.001	0.001
	n	178	178	178	178
Croma	r	- 0.180	0.284	1.000	- 0.674
	p >	0.016	0.001		0.001
	n	178	178	178	178
Tono	r	0.700	- 0.606	- 0.674	1.000
	p >	0.001	0.001	0.001	
	n	178	178	178	178
Almacenamiento 20 °C					
		L*	I.D	Croma	Tono
pH	r	- 0.614	0.534	0.072	- 0.283
	p >	0.001	0.001	0.336	0.001
	n	180	180	180	180
L*	r	1.000	- 0.575	- 0.186	0.432
	p >		0.001	0.013	0.001
	n	180	180	180	180
I.D	r	0.534	1.000	0.440	- 0.651
	p >	0.001		0.001	0.001
	n	180	180	180	180
Croma	r	- 0.186	0.440	1.000	- 0.797
	p >	0.013	0.001		0.001
	n	180	180	180	180
Tono	r	0.432	- 0.615	- 0.797	1.000
	p >	0.001	0.001	0.001	
	n	180	180	180	180

PUBLICACIÓN

1 **PROTEOLYTIC AND LIPOLYTIC CHANGES IN BEEF INOCULATED WITH**
2 **SPOILAGE MICROORGANISMS AND BIOPROTECTIVE LACTIC ACID**
3 **BACTERIA**

4

5

6 Marcelo Signorini^{1,2,*}, Edith Ponce-Alquicira¹ and Isabel Guerrero-Legarreta¹.

7

8 ¹Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Apartado Postal
9 55-535, C.P. 09340 Mexico D.F., Mexico (Tel.: (52) 55 58044717 and
10 55 5804 4726; Fax: (52) 55 5804 4712, e-mail: fave@xanum.uam.mx);

11 ²Departamento de Salud Pública Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias,
12 Universidad Nacional del Litoral, Provincia de Santa Fe, Argentina.

13

14

15

16 *Corresponding autor

17 Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Apartado Postal
18 55-535, C.P. 09340 Mexico D.F., Mexico (Tel.: (52) 55 58044717 and
19 55 5804 4726; Fax: (52) 55 5804 4712, e-mail: fave@xanum.uam.mx

20 ABSTRACT

21

22

23 The use of a controlled lactic fermentation has been studied by several authors as a means
24 to extend meat shelf-life without notably altering its sensory quality. Growth and
25 metabolite production by spoilage microorganisms as well as by bioprotective strains are
26 influenced by storage conditions. The objective of this work was to study the effect of
27 temperature and storage time upon the growth and metabolite production of 4 spoilage
28 bacteria and 3 bioprotective lactic acid strains in vacuum packaged, finely cut beef.
29 Lipolysis was mainly due to the presence of *B. thermosphacta* at 4 °C and at 20 °C, whereas
30 proteolysis was mainly caused by pseudomonads. Presence of *L. minor*, a
31 heterofermentative strain, did not promote proteolysis nor lipolysis at either temperature.
32 No considerable lipolysis was observed until day 8 of storage in samples inoculated with
33 bioprotective strains, but increased at day 12 when stored at 20°C; no proteolysis was
34 observed at any storage temperature.

35 INTRODUCTION

36
37 Increasing interest in food safety and quality by consumers gives shelf-life evaluation a
38 new significance. At present, consumers tend to reject shelf life extension by the addition of
39 chemical preservatives. This tendency makes necessary the development of foods with no
40 or "natural" preservatives, as well as minimally processed (1-3). The use of a controlled
41 lactic fermentation as a means to extend meat shelf life has been studied in conjunction to
42 other techniques, preventing considerable alteration on meat quality.

43
44 Bacterial growth and metabolism on meat substrates promote chemical changes such as
45 protein and lipid degradation as well as biogenic amine, aldehyde and ketone generation
46 (4). The extent of these reactions is influenced by intrinsic and extrinsic factors such as
47 temperature, relative humidity, muscle composition and presence of antibacterial
48 compounds (5). In addition, several bacterial strains have been reported to be exceptionally
49 active protease and lipase producers (6).

50
51 Reports on spoilage microorganisms describe the activity of individual enzymes isolated
52 from various strains as well as the optimal pH, moisture content and temperature required
53 for their activity (5-11). Other authors (4, 12) studied the effect of spoilage microflora in
54 meats and model systems. However, studies on the effect of bioprotective strains on protein
55 and lipid components of meat are scattered (3, 13, 14).

56
57 Among the mechanism of selected lactic acid bacteria (LAB) to control undesirable
58 microflora are substrate competition, production of bacteriostatic compounds and rapid
59 growth on a given substrate (2, 3). The use of LAB with the aim to extend meat shelf life,
60 was reported by Guerrero *et al* (15) and Leisner *et al* (16), among other authors. However,
61 as meat cannot be sterilized before starter addition, it is important to know the effect of
62 spoilage microflora as well as the inoculated LAB in order to predict possible changes in
63 meat composition.

64
65 The objective of this work was to study the effect of temperature and time of storage of
66 vacuum packed beef inoculated with 4 strains used as spoilage indicators and 3
67 bioprotective lactic strains on pH, protein and lipid degradation.

68 MATERIAL AND METHODS

69

70 Meat samples

71

72 Samples were obtained by excising beef Psoas major from 3 animals 6 to 7 h after
73 slaughtering and evisceration. No breed, age, sex or pre mortem handling were recorded. In
74 order to decrease surface microbial populations, the excised muscle was flamed with a
75 torch, burnt surfaces were cut with sterile knives. Finally, they were finely chopped,
76 divided into 50 g portions and inoculated with the studied strains.

77

78 Inocula preparation

79

80 The strains used as spoilage indicators were: *Pseudomonas fluorescens* B52, an active
81 proteolytic microorganism isolated from pork in our laboratory (17); *Pseudomonas fragi*
82 ATCC-4973 reported as a proteolytic and lipolytic strain; *Brochothrix thermosphacta*
83 NCIB-10018 (United Kingdom) commonly found in meats, and *Lactobacillus minor* 119B
84 an heterofermentative lactic acid bacteria supplied by Queen's University of Belfast. The
85 lyophilized strains were reactivated in TSB broth (Difco, Detroit) during 24 hours at 30°C.
86 The cells suspensions were then centrifuged at 4000 x g for 10 min at 4°C, the pellets were
87 resuspended in sterile distilled water to obtain 10⁴-10⁵ CFU/mL final concentration. Two
88 milliliters of each cell suspension were separately inoculated to 50 g of meat
89 (approximately 10³ CFU/g of meat).

90

91 The bioprotective strains were: *Lactobacillus carnis* MXVK76 also supplied by Queen's
92 University of Belfast; *Lactobacillus pentosus* (Christian Hansen, LP1-31035) and
93 *Staphylococcus carnosus* (Christian Hansen, MC1-02055) both strains were kindly
94 supplied by Chr. Hansen, Denmark. All LAB were isolated from raw meat and selected on
95 the basis of their limited proteolytic, lipolytic and decarboxylase activity, previously
96 determined by the methods reported by Braun *et al* (6) and Bover-Cid and Holzapfel (18).
97 The inocula were prepared in the same way as the spoilage strains, using APT broth
98 (Becton Dickinson, Cockeysville) to obtain 10⁵ CFU/g meat. The control was meat added
99 with 2 mL sterile distilled water.

100

101 Sample inoculation and storage

102

103 Meat samples were randomly allocated to treatments (inoculation with one spoilage or LAB
104 strain). The inoculated samples were placed into Cryovac™ LB-50 bags (Cryovac Division,
105 W.R. Grace and Co, Duncan) and packaged using a Multivac D-8941 equipment (Koch,
106 Kansas City) at -700 mBar. Two storage temperatures were tested: 4°C (normal
107 refrigeration temperature) and 20°C (temperature abuse condition) for 12 days. Storage at
108 20°C simulated the average ambient temperature of Central Mexico and other subtropical
109 regions (15).

110

111 Microbial populations

112

113 Ten grams of meat were added with 90 mL sterile distilled water and homogenized in a
114 blender (Oster, Bartlesville). Serial dilutions were inoculated on selective media for each

115 microorganisms: *B. thermosphacta* in STAA agar (19); LAB in MRS agar (Merck,
116 Germany); *Pseudomonas spp.* in agar F (Becton Dickinson, Mexico) containing 100,000 IU
117 G-penicillin (sodium salt) per liter of medium. Cultures were incubated for 2 days at 30°C.
118 Heterofermentative LAB populations were determined as colonies growing in APT broth
119 (Becton Dickinson, Mexico) for 24 h at 30°C under Durham bells. The presence of gas was
120 considered an indicator of heterofermentative strains growth.

121

122 pH

123

124 It was measured in a Beckman pH-meter (Beckman, Fullerton) by mixing 10 g of sample
125 and 90 mL deionized water.

126

127 Proteolytic activity

128

129 Protein extraction was carried out according to the method reported by Ngapo *et al* (20).
130 Meat was homogenized with cold water (4°C) and ice (1:1:1) in a blender (Oster,
131 Bartesville) for 10 minutes. The meat slurry was passed through a 3 mm stainless steel
132 mesh to remove collagen; the retained fraction was further washed with water at 4°C (2:3,
133 w/w) and centrifuged at 2000 X g for 12 minutes. The supernatant was discarded and the
134 pellet resuspended in 0.6 M NaCl + 50 mM sodium phosphate, pH 7 to obtain 5 mg/mL
135 final protein concentration.

136

137 Twenty five micro liters of the protein solution was added (1:4) to 2% SDS + 5%
138 2-β-mercaptoethanol. The protein solution was stored at -18 °C. Just before analysis,
139 samples were thawed, boiled for 4 min and applied to the gel. The extract was analyzed by
140 SDS-PAGE (21). Twelve percent was used as separation gels and 4% as stacking gels in a
141 Mini-Protean II slab cell (Bio-Rad, Richmond), using 25 to 250 kDa markers (Sigma
142 Chemical, St. Louis). The analysis was carried out at 200 volts constant voltage during 45
143 minutes. After staining with 1% Coomassie blue and developing with methanol:acetic
144 acid:water (40:10:50 v/v), the gels were scanned in a Gel-Doc 2000 (Bio-Rad, Richmond)
145 fitted with a Quantity One™ software, version 4 (Bio-Rad, Richmond).

146

147 Degradation of extracted myofibrillar proteins was taken as proteolytic activity indicator.
148 Densities of the bands corresponding to the myosin heavy chain (MHC) and total myosin
149 are correlated (22), proteolytic activity index can be calculated from the following
150 equation:

$$151 \text{ \% MHC} = [\text{MHC band density} / \Sigma \text{ density all bands}] 100 \quad (1)$$

152

153 Lipolytic activity

154

155 Oleic acid being the most abundant fatty acid in beef (23), its concentration as free fatty
156 acid were taken as lipolysis indicator. It was determined according to the method reported
157 by the AOAC (24); 0.5 g meat was mixed with 6 mL 0.5N NaOH in methanol and boiled
158 for 10 min; 7 mL 14% boron trifluoride-methanol (Aldrich, Milwaukee) was added and the
159 mixture boiled for 5 min. Finally, 1 mL hexane (Baker, Mexico) was added and the sample
160 boiled for 1 min. The hexane extract was injected to a Hewlett Packard 6890 gas
161 chromatograph fitted with a 30 m x 0.25 mm Supelcowax™ column (Supelco™) using a

162 flame ionization detector. The isothermal conditions were: 195°C oven temperature and
163 250°C injector and detector temperature. Free fatty acid standards (myristic, palmitic,
164 palmitoleic, stearic, oleic, linoleic and linolenic acids) (Sigma Chemical, St. Louis) were
165 used for calibration.

166

167 Statistical analysis

168

169 Samples were randomly allocated to a 8x2x4 factorial design (strains: control, *L. carnis*, *L.*
170 *pentosus*, *S. carnosus*, *P. fluorescens*, *P. fragi*, *B. thermosphacta* and *L. minor*; storage
171 temperature: 4 and 20°C; storage time: 0, 4, 8, 12 days). The response variables were
172 bacterial counts, pH, proteolytic and lipolytic activity. Data were subjected to analysis of
173 variance and Duncan's multiple range tests with 3 replicates. Analysis were carried out
174 using a SAS package (25).

175 . RESULT AND DISCUSSION

176
177 Microbial population

178
179 Initial microbial loads in samples were: 10^3 CFU/g *Pseudomona spp.*; 10^3 CFU/g *B.*
180 *thermosphacta*; 10^5 - 10^6 CFU/g total LAB and 10^4 CFU/g heterofermentative LAB (Figure
181 1).

182
183 *P. fluorescens* and *P. fragi* showed different growth patterns according to the storage
184 temperature (Figure 2). The initial pseudomonads population was similar to the one
185 reported by other authors (15, 26, 27). However, conversely as found by the same authors,
186 the population after 12 days of storage was lower by 1 log cycle.

187
188 As expected, *P. fluorescens* final population was 1 log cycle CFU/g higher when samples
189 were stored at 20°C as compared to 4°C ($p>0.001$) whereas *P. fragi* growth was 1 to 2 log
190 cycles higher at 20°C ($p>0.001$). The optimal temperature rate for both strains is 20°C (28)
191 although the faster growth observed for *P. fragi* could be due to higher proportion of this
192 strain with respect to total microflora in raw meat, in agreement with Greer (29) who
193 reported that *P. fragi* is the most conspicuous psychrotroph in raw meat as a consequence
194 of its ability to successfully compete with other species. Although *Pseudomonas spp.* are
195 aerobic microorganisms, they grew in the samples because storage was in oxygen-reduced
196 conditions, not in total vacuum, enough to support initial pseudomonads growth.

197
198 *B. thermosphacta* showed similar growth rates at both storage temperatures, no statistical
199 difference was observed ($p>0.278$). This could be explained by the ability of this strain to
200 grow at a wide temperature range (12). As reported by these authors, *B. thermosphacta*
201 growth in vacuum packaged meat produces L-(+)-lactic acid, as well as acetoin, isobutyric
202 and isovaleric acids from aerobic utilization of glucose. *B. thermosphacta* growth has been
203 also observed in meat stored at 4°C (4, 12) The competitive microflora in the samples,
204 mainly bioprotective LAB, could have a slower growth rate at 4°C as compared to samples
205 stored at 20°C (28, 29). An extended lag phase and nutrient competition reduced the
206 number of *B. thermosphacta* in the presence of natural anaerobic flora in samples at 20 °C
207 (30)

208
209 *L. minor* showed the fastest growth (10^8 and 10^6 - 10^7 CFU/g at 20 and 4°C, respectively at
210 day 4) (Figure 2). After day 4, growth at both temperatures was constant, showing a slight
211 decrease after day 8. However, no statistical difference was found between storage
212 temperatures ($p>0.181$). This microorganism has the capacity to grow in anaerobic
213 conditions as well as under refrigeration (28). Being a heterofermentative strain, metabolite
214 production such as acetic and succinic acids, carbon dioxide, H₂ or acetoin turns meat
215 unacceptable (12).

216
217 *L. carnis*, *L. pentosus* and *S. carnosus* reached populations above 10^7 CFU/g after 4 days of
218 storage at 4°C as compared to populations above 10^8 CFU/g in samples stored at 20°C. A
219 significant difference between storage temperatures was observed ($p>0.001$) (Figure 3). In
220 general, bioprotective strains are developed to grow at refrigeration temperatures, as they
221 are inoculated in fermented sausages subjected to temperatures around 10°C during

222 ripening (31). In our study, the growth of biopreservative strains showed populations up to
223 10^7 CFU/g during the first 4 days under refrigeration and up to 10^8 CFU/g when samples
224 were stored at 20°C. Bioprotective strains easily adapted to the meat substrate and to the
225 environment. When compared to *P. fluorescens*, *P. fragi* and *B. thermosphacta*, LAB
226 reached counts 1 to 2 log cycles higher at both storage temperature after 4 days of storage,
227 indicating that bioprotective strains could successfully compete with spoilage
228 microorganisms. As this competition is mainly for nutrients LAB growth produces
229 antibacterial compounds such lactic acid or bacteriocins, extending meat shelf life (15).

230

231 pH

232

233 Food pH has a profound effect on microbial growth, viability and metabolite production.
234 Optimum growth pH for *Pseudomonas spp.* is 5 to 9 (9) whereas *B. thermosphacta* can not
235 grow at pH<5.5 (12). Some *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter*, *Serratia*, *Hafnia*,
236 *Citrobacter*) need pH>5.5 to grow in vacuum-packaged foods (12). Exhaustion of glucose
237 in raw meat does not only affect *Pseudomonas spp.* growth; in addition ammonia
238 production also increases (32). On the other hand, lactic acid produced by
239 homofermentative LAB generated a low pH, hence influencing growth and viability of pH
240 sensitive microorganisms and preventing the growth of pathogens and spoilage
241 microorganisms in meat (3).

242

243 Temperature had a significant effect on pH throughout storage ($p>0.001$). Samples
244 inoculated with *P. fluorescens* and *P. fragi* showed pH>7 when stored at 20°C, except at
245 day 8 to *P. fluorescens* that showed a decrease in pH value (Figure 4). Due to the oxygen
246 restriction in packaged samples, *Pseudomonas spp.* metabolized aminoacids, consequently
247 producing alkaline compounds such as ammonia, promoting an increase in pH by 1.1 units
248 (29, 33, 34). The decrease in pH at day 8 in meat inoculated with *P. fluorescens* was
249 possibly a consequence of changes in microbial population.

250

251 Storage temperature had a significant effect on pH in samples inoculated with *B.*
252 *thermosphacta* ($p>0.001$). pH increased throughout storage in meat stored at 20°C reaching
253 values above 7, similar to values found in samples inoculated with pseudomonads (Figure
254 4). Conversely, pH of samples stored at 4 °C was constant and below 5.5 until day 8 with a
255 further increase. At 4°C *B. thermosphacta* was the most abundant microorganism and
256 produced acid from L-(+)-lactate, reducing pH (28).

257

258 Storage temperature had also a significant effect on pH in samples inoculated with
259 bioprotective strains ($p>0.003$) (Figure 5). In meat stored at 4°C, the presence of these
260 strains had no effect on pH. Conversely, in samples stored at 20°C *S. carnosus* and *L.*
261 *pentosus* promoted pH<6 during the first 4 days of storage with a subsequent increase. This
262 trend could be due to the highly acidifying ability of biopreservative strains (31) during the
263 first days of storage, and further proliferation of spoilage microorganisms producing
264 alkaline compounds such as ammonia (4). Gill and Newton (30) reported that after several
265 days of storage at 20°C the dominant meat microflora is *Enterobacteriaceae*; when glucose
266 is exhausted, lactic acid and amino acids are metabolized by *Enterobacteriaceae* and
267 *Pseudomonas spp.* with ammonia production.

268

269 *L. carnis* seemed to be the most efficient acidifying strain, promoting pH<6 during the first
270 8 days in samples stored at 20°C. This was partly due to the high growth rate of this strain
271 (above 10⁸ CFU/ g at day 4) (Figure 5).

272
273 pH in samples inoculated with *L. minor* showed values of 7.07 and 7.6 when stored at 4 and
274 20°C, respectively, at day 12. Storage temperature was significant (p<0.048) in samples
275 inoculated with this strain.

276

277 Proteolytic activity

278

279 Myosin is a hexameric protein composed of four chains of light myosin (LM) and two
280 chains of heavy myosin (MHC). Each MHC chain is *circa* 200 kDa, the four LM chains are
281 15 to 25 kDa (35). These chains split due to the denaturation action of SDS and 2-β-
282 mercaptoethanol, generating three different bands in the electrophoresis gel (MHC, LM-1
283 and LM-2) (36).

284

285 SDS-PAGE of protein extracts obtained from samples inoculated with *P. fluorescens* and
286 stored at 20°C showed significantly more myosin degradation, as compared to the control
287 (p>0.01) (Figure 6). During the first 4 days of storage, 20% of the protein was depleted to
288 smaller fractions; by the end of the storage time only 9.29% of the native molecule
289 remained (Figures 6 and 7). Optimum protease activity of *P. fluorescens* is at pH 7 (37).
290 Since meat pH at 20°C was around this value, myofibrillar proteins underwent extensive
291 degradation. Off-odor was also evident in these samples. According to Greer (29) when
292 oxygen availability is restricted, *Pseudomonas spp.* utilize proteins, even if glucose is
293 present, with the production of volatile compounds.

294

295 Richardson (37) reported that the highest proteolytic activity of this microorganism was at
296 45°C and decreased 30% at 25°C; Chen *et al* (38) reported that at 2°C proteolytic activity on
297 actomyosin was considerably reduced. This facts explained the low protein degradation
298 when the meat was stored at 4°C with no significant difference as compared to the control
299 (p>0.734). *B. thermosphacta* did not show proteolytic activity on myosin at both storage
300 temperatures as compared to the control (p>0.922), in agreement with the results reported
301 by Greer (34) and Dainty and Hibbard (39). Proteolytic activity was not observed in *L.*
302 *minor* (Figure 7).

303

304 At 4°C, *L. carnis*, *L. pentosus* and *S. carnosus* did not show any proteolytic activity and
305 higher concentration of myosin heavy chain protein (p>0.001) than the control (Figures 8
306 and 9) in agreement with Dainty *et al* (40). These authors did not find any proteolytic
307 activity of *Lactobacillus spp.* on myofibrillar proteins, whereas Chen *et al* (38)
308 demonstrated the ability of *L. carnis* to hydrolyze casein *in vitro* but not to deplete muscle
309 proteins. When meat was stored at 20°C, *S. carnosus* showed lower concentration of
310 myosin heavy chain protein than the others bioprotective strains (p>0.05), but significantly
311 higher than control (p>0.05).

312

313 Lipolytic activity

314

315 Pseudomonads strains did not show lipolytic activity on samples stored at 4 or 20°C,
316 expressed as oleic acid concentration (Figure 10). No significant difference was observed
317 for storage temperatures ($p>0.883$). Pseudomonads are able to reach populations of 10^8
318 CFU/g without depleting lipids (34). On the other hand, pseudomonads' lipase activity was
319 reduced to 30% at 45°C, and 95% at 5°C. pH and oxygen availability also affect
320 pseudomonads lipases (41). The highest value was reported at pH 7 whereas only 20% of
321 the original activity was observed at pH 6 (42). Although meat inoculated with
322 pseudomonads had pH<7, partial vacuum notably affects lipolytic activity (43).

323

324 Samples inoculated with *B. thermosphacta* and stored at 20°C had an increase in oleic acid
325 concentration (Figure 10). No significant difference ($p>0.073$) was observed in lipolytic
326 activity in meat stored at 4°C. These results were in agreement with those reported by
327 Dainty *et al* (4). These authors related the presence of *B. thermosphacta* with free fatty
328 acids production, either in aerobic or anaerobic conditions. Papon and Talon (13, 44)
329 reported the highest lipolytic activity of *B. thermosphacta* at pH 6 and 37°C; it was reduced
330 to 50% in refrigeration at pH 6. In meat inoculated with *B. thermosphacta* and stored at
331 4°C, pH was below 6, nonetheless lipolytic activity was detected.

332

333 Lipolysis in samples inoculated with *L. minor* showed no significant difference as
334 compared to the control ($p>0.151$).

335

336 All bioprotective LAB bacteria did not show higher oleic acid concentrations as compared
337 to the control ($p>0.151$) (Figure 11). Papon and Talon (44), reported that lipolysis by LAB
338 was observed halfway of the logarithmic phase; lipase production also increased as glucose
339 concentration decreased. Free fatty acid concentration decreased in meat treated with *S.*
340 *carneus* at both storage temperatures, probably because these acids were metabolized or
341 autoxidized producing aldehydes and ketones (45).

342

343 Papon and Talon (44) reported that pH 6 is the optimum for lipase production by LAB; at
344 pH<6, only 30% of lipase activity was observed. Samples inoculated with LAB and stored
345 at 4°C had pH<6 throughout the study, probably being the reason for the absence of
346 lipolytic activity at this storage temperature pH in samples stored at 20°C was above 6; in
347 these samples oleic acid concentration steadily increased from day 8, although no
348 significant difference was found as compared to the control. Kenneally *et al* (8) reported
349 no noticeable free fatty acid concentration increase in fermented sausages inoculated with
350 *S. carnosus*, although Hammes *et al* (46) found tributyrin degradation *in vitro* by *S.*
351 *carneus*.

352 CONCLUSIONS

353

354 Pseudomonads populations were considerably low at both storage temperatures (4 and
355 20°C) as compared to other strains, especially bioprotective LAB. As expected, meat pH
356 inoculated with bioprotective strains and stored at 4°C was below 6. Meat inoculated with
357 spoilage microorganisms (*P. fluorescens*, *P. fragi*, *B. thermosphacta* and *L. minor*) showed
358 an increasing trend in pH throughout the study time.

359

360 Meat spoilage is a result of a number of chemical changes, proteolysis is one and probably
361 the most important as it produces smaller molecules that can be metabolized by spoilage
362 microflora. Extensive proteolysis and subsequent peptide degradation and decarboxylation,
363 promotes biogenic amines production, these compounds are responsible for the putrid odor
364 of meat. Storage conditions in this study allowed protease production by *Pseudomonas*
365 spp., but not by *B. thermosphacta* or *L. minor*. It can be concluded that special attention
366 must be taken to reduction of pseudomonads counts by bioprotective LAB to avoid
367 proteolytic spoilage. This could result in successful competition by bioprotective strains
368 reducing even further pseudomonads populations in meat substrates.

369

370 Refrigeration temperatures, low pH, an oxygen-reduced environment and a slow population
371 growth could explain the absence of lipolytic activity by pseudomonads, conversely the
372 presence of *B. thermosphacta* contributed to lipolytic spoilage. The proteolytic ability is
373 important when considering a LAB as a bioprotective strain, if the objective is to reduce
374 undesirable microflora without considerably altering meat sensory properties.

375

376 Bioprotective strains are expected not to be lipolytic. Therefore, as no considerable
377 lipolysis was observed in samples before day 8 of storage, it was assumed that storage up to
378 8 days at 4°C did not promoted lipolysis by bioprotective strains, but extensive proteolysis
379 occur in samples stored during 12 days at 20°C.

380 . ACKNOWLEDGEMENTS

381

382 Author Signorini thanks the Secretariat of Foreign Affairs, Mexico, for a graduate
383 scholarship under the Cuauhtemoc II Program. The authors thank Dr. Victor Kuri (Queen's
384 University of Belfast) and Dr. Lone Andersen (Christian Hansen) for supplying *L. minor*
385 and *L. carnis* strains and *L. pentosus* and *S. carnosus* strains, respectively.

386 REFERENCES

387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432

1. Cudjoe, K.S.; Kapperud, G. The Effect of Lactic Acid Sprays on *Campylobacter jejuni* Inoculated onto Poultry Carcasses. *Acta Vet. Scand.* **1991**, *32*, 491-498.
2. Hugas, M. Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria for the Biopreservation of Meat and Meat Products. *Meat Sci.* **1998**, *49 (Suppl. 1)*, S139-S150.
3. Stiles, M.E. Biopreservation by Lactic Acid Bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* **1996**, *70*, 331-345.
4. Dainty, R.H.; Edwards, R.A.; Hibbard, C.M.; Marnewick, J.J. Volatile Compounds Associated with Microbial Growth on Normal and High pH Beef Stored at Chill Temperatures. *J. Appl. Bacteriol.* **1989**, *66(4)*, 281-289.
5. Fadda, S.; Vignolo, G.; Holgado, P.R.; Oliver, G. Proteolytic Activity of *Lactobacillus* Strains Isolated from Dry-fermented Sausages on Muscle Sarcoplasmic Proteins. *Meat Sci.* **1998**, *49(1)*, 11-18.
6. Braun, P.; Fehlhaber, K.; Klug, C.; Kop, K. Investigations into the Activity of Enzymes Produced by Spoilage-causing Bacteria: A Possible Basis for Improved Shelf-life Estimation. *Food Microbiol.* **1999**, *16*, 531-540.
7. Gilbert, E.J.; Cornish, A.; Jones, C.W. Purification and Properties of Extracellular Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF2. *J. Gen. Microbiol.* **1991**, *137*, 2223-2229.
8. Kenneally, P.M.; Leuschner, R.G.; Arendt, E.K. Evaluation of the Lipolytic Activity of Starter Cultures for Meat Fermentation Purposes. *J. Appl. Microbiol.* **1998**, *84*, 839-846.
9. Kordel, M.; Hofmann, B.; Schomburg, D.; Schmid, R.D. Extracellular Lipase of *Pseudomonas* sp. Strain ATCC 21808: Purification, Characterization, Crystallization and Preliminary X-ray Diffraction Data. *J. Bacteriol.* **1991**, *173(15)*, 4836-4841.
10. Sugihara, A.; Ueshima, M.; Shimada, Y.; Tsunasawa, S.; Tominaga, Y. Purification and Characterization of a Novel Thermostable Lipase from *Pseudomonas cepacia*. *J. Biochem.* **1992**, *112*, 598-603.
11. Young Lee, S.; Shick Rhee, J. Production and Partial Purification of a Lipase from *Pseudomonas putrida* 3SK. *Enz. Microb. Technol.* **1993**, *15*, 617-623.
12. Nychas, G.J.; Dillon, V.M.; Board, R.G. Glucose: the Key Substrate in the Microbial Changes Occurring in Meat and Certain Meat Products. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1988**, *10*, 203-231

- 433 13. Papon, M.; Talon, R. Factors Affecting Growth and Lipase Production by Meat
434 Lactobacilli Strains and *Brochothrix thermosphacta*. J. Appl. Bacteriol. 1988, 64,
435 107-115.
436
- 437 14. Stahnke, L.H. Dried Sausages Fermented with *Staphylococcus xylosus* at Different
438 Temperatures and with Different Ingredient Levels. Part I. Chemical and
439 Bacteriological Data. Meat Sci. 1995, 41(2), 179-191.
440
- 441 15. Guerrero-Legarreta, I.; Mendiola, R.; Ponce, E. Inoculation of Lactic Acid Bacteria
442 on Meat Surfaces as a Means of Decontamination in Semitropical Conditions. Meat
443 Sci. 1995, 40(3), 397-411.
444
- 445 16. Leisner, J.J.; Greer, G.G.; Dilts, B.D.; Stiles ME. Effect of Growth of Selected
446 Lactic Acid Bacteria on Storage Life of Beef Stored under Vacuum and Air. Int. J.
447 Food Microbiol. 1995, 26, 231-243.
448
- 449 17. Alanís, E.; Lara, P.; Guerrero, I. Effect of Proteases from *Pseudomons* sp. on the
450 Integrity of Myofibrillar Proteins. Food Chem. 1999, 67, 45-51.
451
- 452 18. Bover-Cid, S.; Holzapfel, W.H. Improved Screening Procedure for Biogenic
453 Amines Production by Lactic Acid Bacteria. International J. Food Microbiol. 1999,
454 53, 33-41.
455
- 456 19. Gardner, G.A. A Selective Medium for the Enumeration of *Microbacterium*
457 *thermosphactum* in Meat and Meat Products. J. Appl. Bacteriol. 1966, 29(3), 455-
458 460.
459
- 460 20. Ngapo, T.; Wilkinson, B.; Chong, R.; Haisman, D. Gelation of Bovine Myofibrillar
461 Protein Induced by 1,5-gluconolactone. In 38th International Congress of Meat
462 Science and Technology, Clermont-Ferrand, France. 1992, p. 1095-1098.
463
- 464 21. Laemmli, U.K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of
465 Bacteriophage T4. Nature. 1970, 227, 680-685.
466
- 467 22. Chawla, S.P.; Venugopal, V.; Nair, P.M. Gelation of Proteins from Washed Muscle
468 of Threadfin Bream (*Nemipterus japonicus*) under Mild Acid Conditions. J. Food
469 Sci. 1996, 61(2), 362-366, 371.
470
- 471 23. Rhee, K.S. Fatty acids in meats and meats products. In *Fatty acids in Foods and*
472 *their Health Implications*; Chow, C.K. Ed.; Marcel Dekker Inc. 1992, p 65-93.
473
- 474 24. AOAC. Official Methods of Analysis. 15th edition. Washington DC: Association of
475 Official Analytical Chemists. 1990.
476
- 477 25. SAS Institute. JMP Statistics and Graphics Guide. Version 3.1. SAS Institute, Cary,
478 NC. 1995.
479

- 480 26. Zamora, M.C.; Zaritzky, N.E. Potassium Sorbate Inhibition of Microorganisms
481 Growing on Refrigerated Packaged Beef. *J. Food Sci.* **1987**, *52(2)*, 257-262.
482
- 483 27. Delaquis, P.J.; McCurdy, A.R. Colonization of Beef Muscle Surfaces by
484 *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi*. *J. Food Sci.* **1990**, *55(4)*, 898-
485 902,905.
486
- 487 28. Holt, J.R.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T.; Williams, S.T. *Bergey's*
488 *Manual of Determinative Bacteriology*, 9th edition. Baltimore, Williams and
489 Wilkins. **1994**, p. 787.
490
- 491 29. Greer, G.G. Bacteria and Meat Quality. In *31st Canadian Institute of Food Science*
492 *and Technology Annual Conference*. Winnipeg: CIFST. **1988**.
493
- 494 30. Gill, C.O.; Newton, K.G. Growth of Bacteria on Meat at Room Temperatures. *J.*
495 *Appl. Bacteriol.* **1980**, *49*, 315-323.
496
- 497 31. Christian Hansen. Product Information. Meat cultures. Horsholm, Denmark. **1995**.
498
- 499 32. Gill, C.O. Substrate Limitation of Bacterial Growth at Meat Surfaces. *J. Appl.*
500 *Bacteriol.* **1976**, *41*, 401-410.
501
- 502 33. Wing, L.P.; Yada, R.Y.; Skura, B.J. Electron Microscopic Investigation of
503 *Pseudomonas fragi* ATCC 4973 on Intact and Sarcoplasm-depleted Bovine
504 *Longissimus dorsi* Muscle at 21°C. *J. Food Sci.* **1983**, *48(2)*, 475-477, 500.
505
- 506 34. Greer, G. Meat. In *Enzymes of Psychrotrophs in Raw Food*. Mckellar R.C., editor
507 Boca Raton: CRC Press, Inc. **1989**, p 267-292.
508
- 509 35. Xiong, Y.L. Myofibrillar Protein from Different Muscle Fiber Types: Implications
510 of Biochemical and Functional Properties in Meat Processing. *Crit. Rev. Food Sci.*
511 *Nutr.* **1994**, *34(3)*, 293-320.
512
- 513 36. Claeys, E.; Uytterhaegen, L.; Buts, B.; Demeyer, D. Quantification of Beef
514 Myofibrillar Proteins by SDS-PAGE *Meat Sci.* **1995**, *39*, 177-193.
515
- 516 37. Richardson, B.C. The Purification and Characterization of a Heat-stable Protease
517 from *Pseudomona fluorescens* B52. *New Zeland J. Dairy Sci. Technol.* **1982**, *16*,
518 195-207.
519
- 520 38. Chen, M.T.; Ockerman, H.W.; Cahill, V.R.; Plimpton, R.F.; Parrett, N.A. Solubility
521 of Muscle Proteins as a Result of Autolysis and Microbiological Growth. *J. Food*
522 *Sci.* **1981**, *46(4)*, 1139-1143.
523
- 524 39. Dainty, R.H.; Hibbard, C.M. Aerobic Metabolism of *Brochothrix thermosphata*
525 Growing on Meat Surfaces and in Laboratory Media. *J. Appl. Bacteriol.* **1980**,
526 *48(3)*, 387-396.

527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550

40. Dainty, R.H.; Shaw, B.G.; De Boer, K.A.; Scheps, E.S.J. Protein Changes Caused by Bacterial Growth on Beef. *J. Appl. Bacteriol.* **1975**, *39(1)*, 73-84.
41. Lee, S.Y.; Rhee, J.S. Production and Partial Purification of a Lipase from *Pseudomonas putrida* 3SK. *Enz. Microb. Technol.* **1993**, *15*, 617-623.
42. Adams, D.M.; Brawley, T.G. Factors Influencing the Heat Resistance of a Heat-Resistant Lipase Of *Pseudomonas*. *J. Food Sci.* **1981**, *46*, 673-676.
43. Stead, D. Microbial Lipases: Their Characteristics, Role in Food Spoilage and Industrial Uses. *J. Dairy Res.* **1986**, *53*, 481-505.
44. Papon, M.; Talon, R. Cell Location and Partial Characterization of *Brochothrix thermosphacta* and *Lactobacillus curvatus* Lipases. *J. Appl. Bacteriol.* **1989**, *66(3)*, 235-242.
45. Stahnke, L.H. Dried Sausages Fermented with *Staphylococcus xylosus* at Different Temperatures and with Different Ingredient Levels. Part II. Volatile Compounds. *Meat Sci.* **1995**, *41(2)*, 193-209.
46. Hammes, W.P.; Bosch, I.; Wolf, G. Contribution of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus piscifermentans* to the Fermentation of Protein Foods. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* **1995**, *79*, 76S-83S.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1: Microbial population in control meat stored at 4 °C and 20 °C.

Figure 2: Population of spoilage bacteria in meat stored at 4 °C and 20 °C.

Figure 3: Population of bioprotective bacteria in meat stored at 4 °C and 20 °C.

Figure 4: pH in meat inoculated with spoilage bacteria and stored at 4 °C and 20 °C.

Figure 5: pH in meat inoculated with bioprotective bacteria and stored at 4 °C and 20 °C.

Figure 6: SDS-PAGE of proteins extracts from beef samples inoculated with *P. fluorescens* and stored at 20 °C.

Figure 7: Concentration of myosin in beef inoculated with spoilage bacteria and stored at 4 °C and 20 °C.

Figure 8: SDS-PAGE of proteins extracts from beef samples inoculated with biopreservative strains and stored at 4 °C.

- a) *L. carnis*
- b) *L. pentosus*
- c) *S. carnosus*

Figure 9: Concentration of myosin in beef inoculated with bioprotective bacteria and stored at 4 °C and 20 °C.

Figure 10: Concentration of oleic acid in meat inoculated with spoilage bacteria and stored at 4 °C and 20 °C.

Figure 11: Concentration of oleic acid in meat inoculated with bioprotective bacteria and stored at 4 °C and 20 °C.

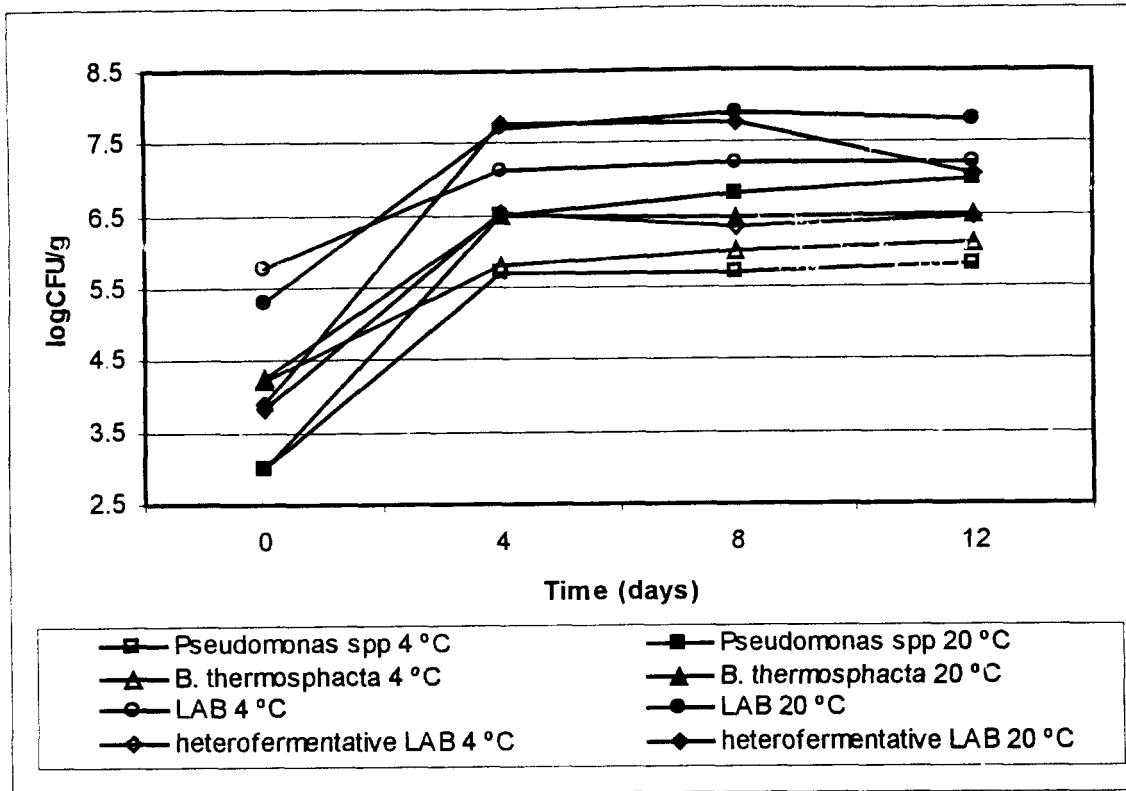


Figure 1

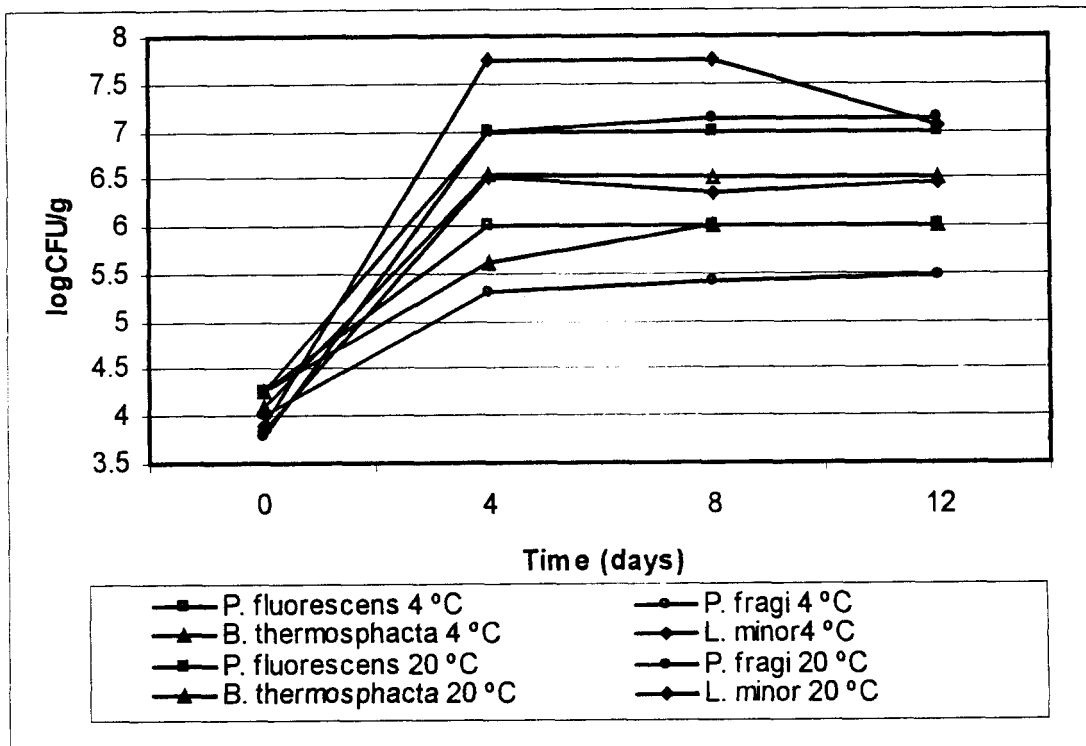


Figure 2

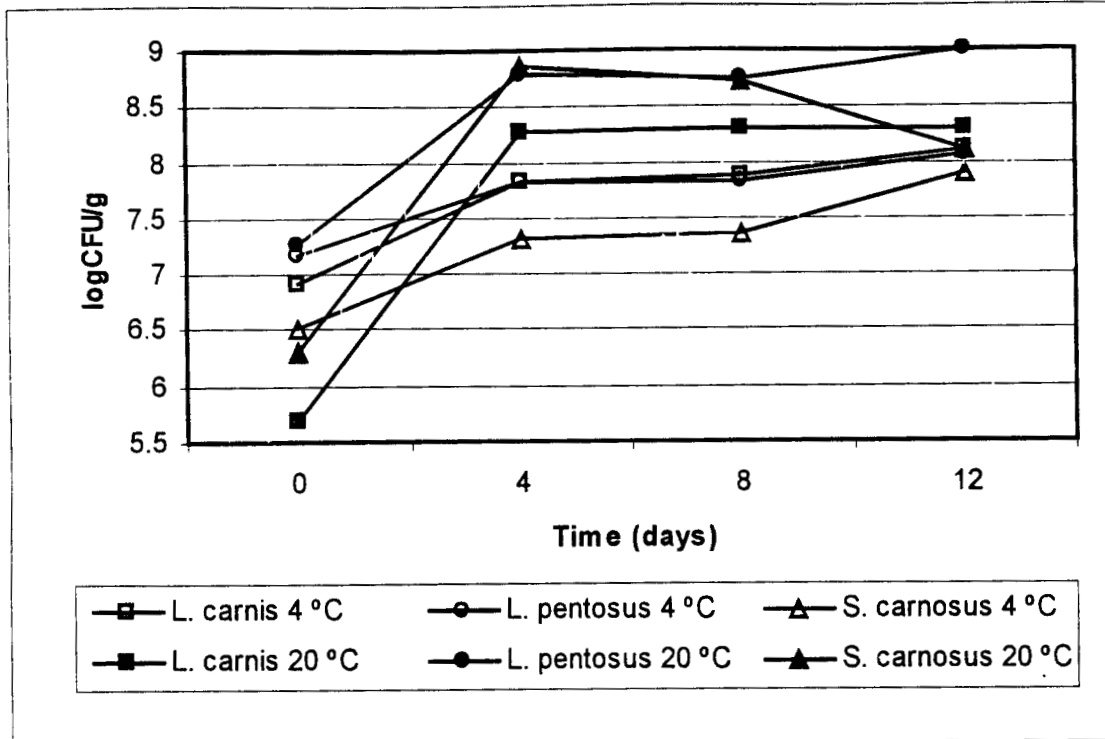


Figure 3

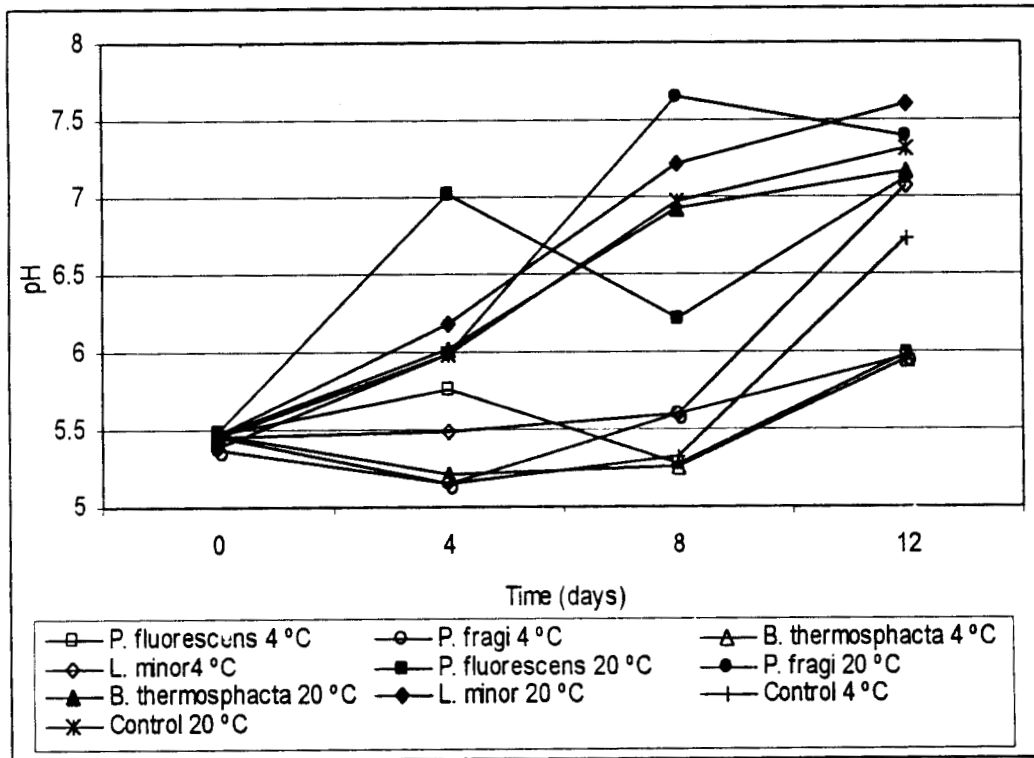


Figure 4

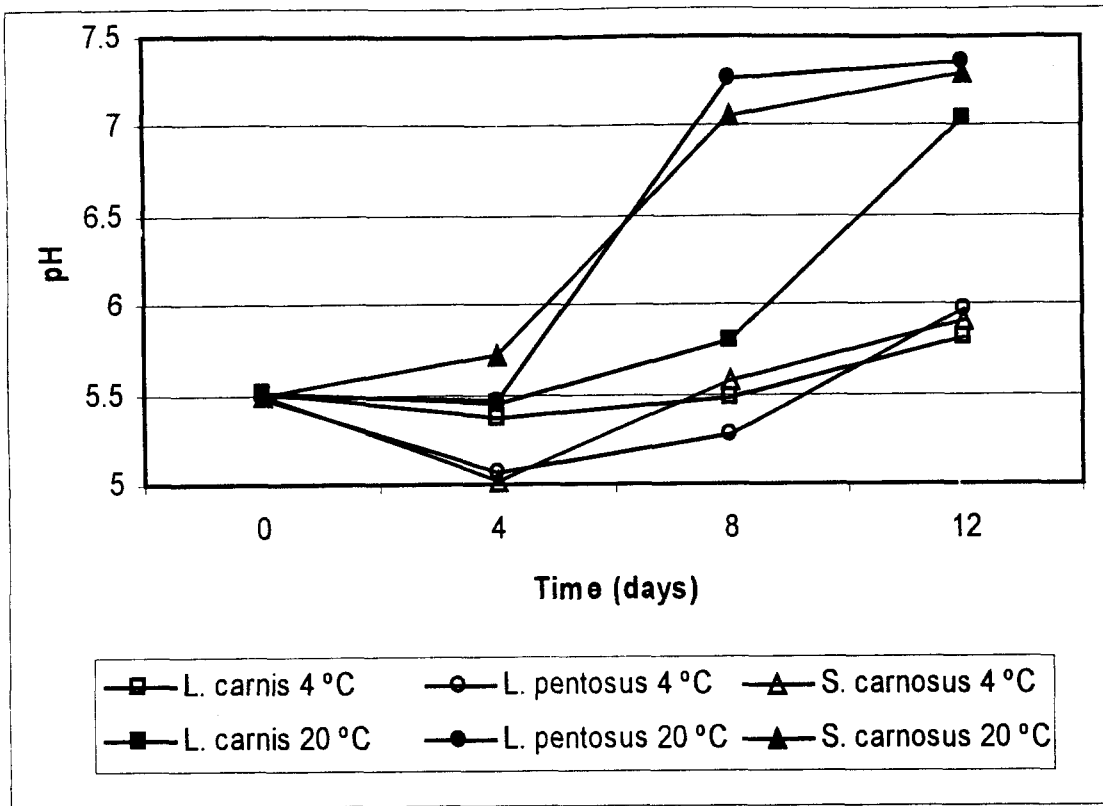


Figure 5

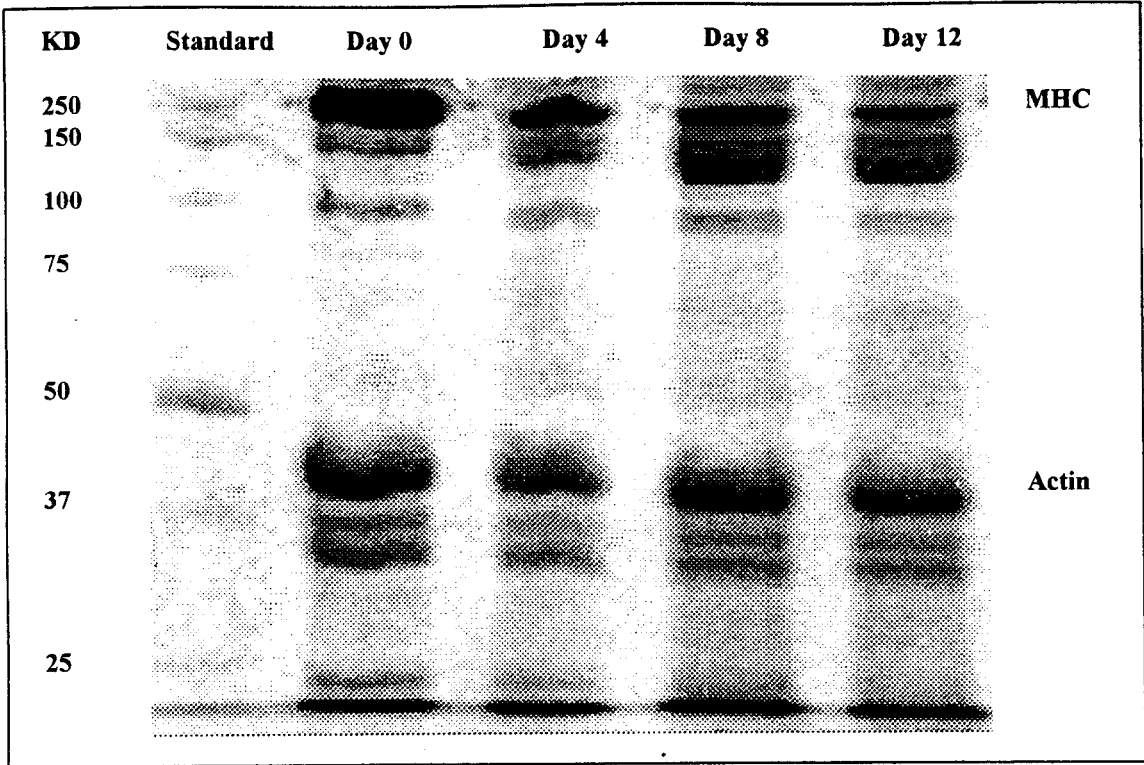


Figure 6

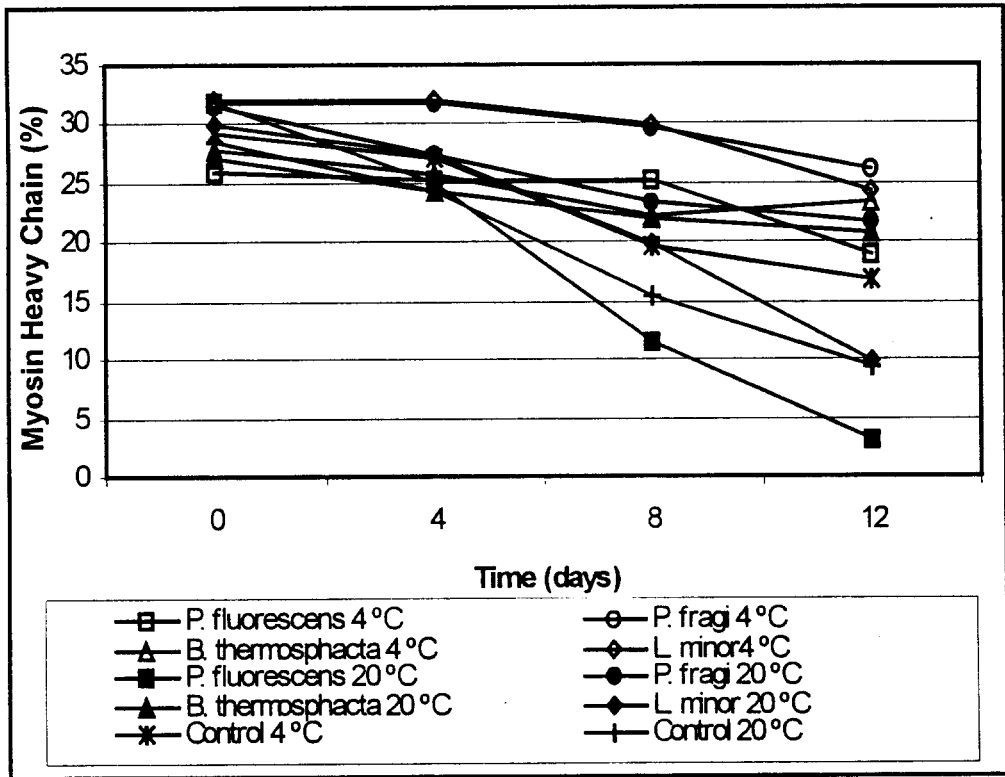


Figure 7

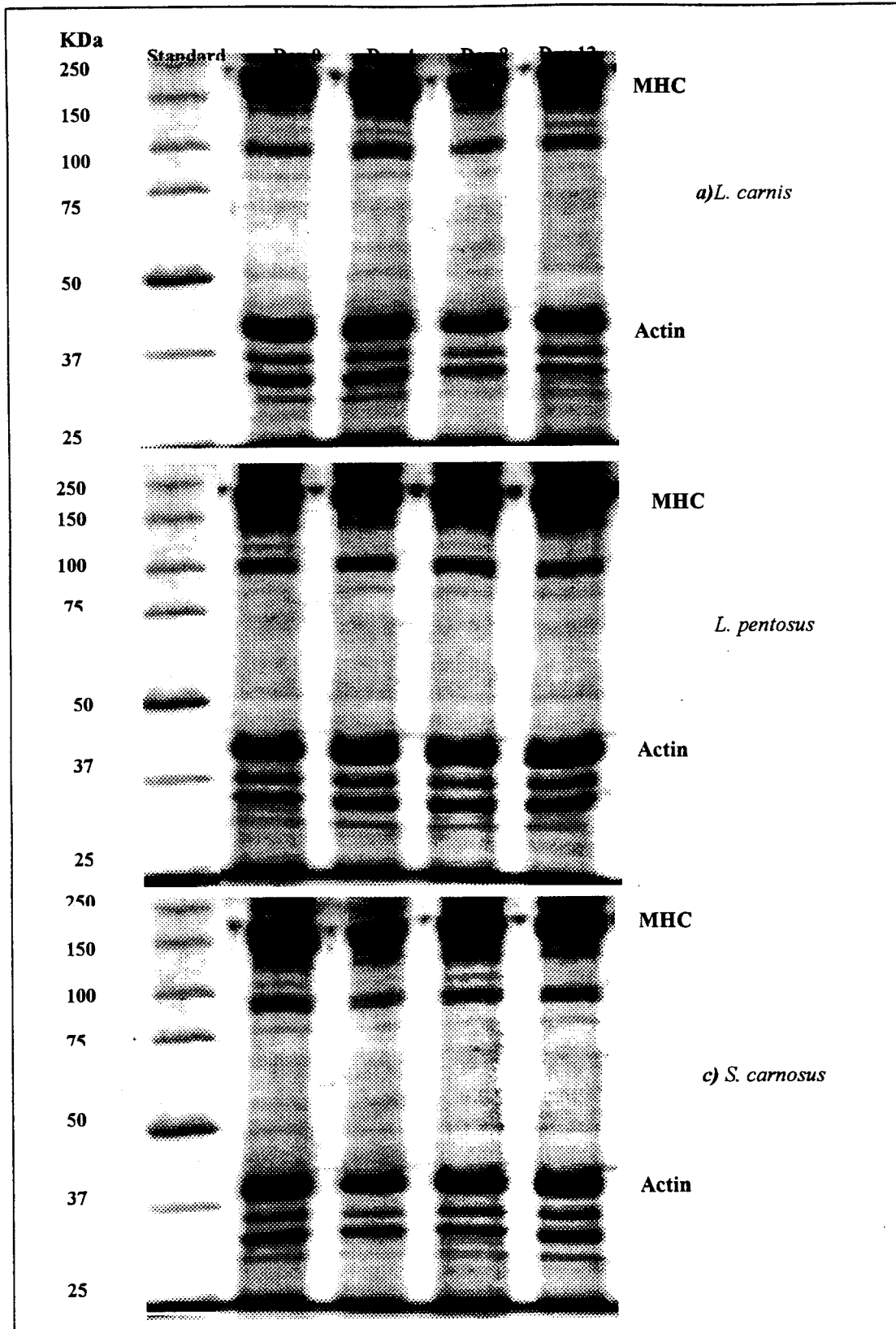


Figure 8

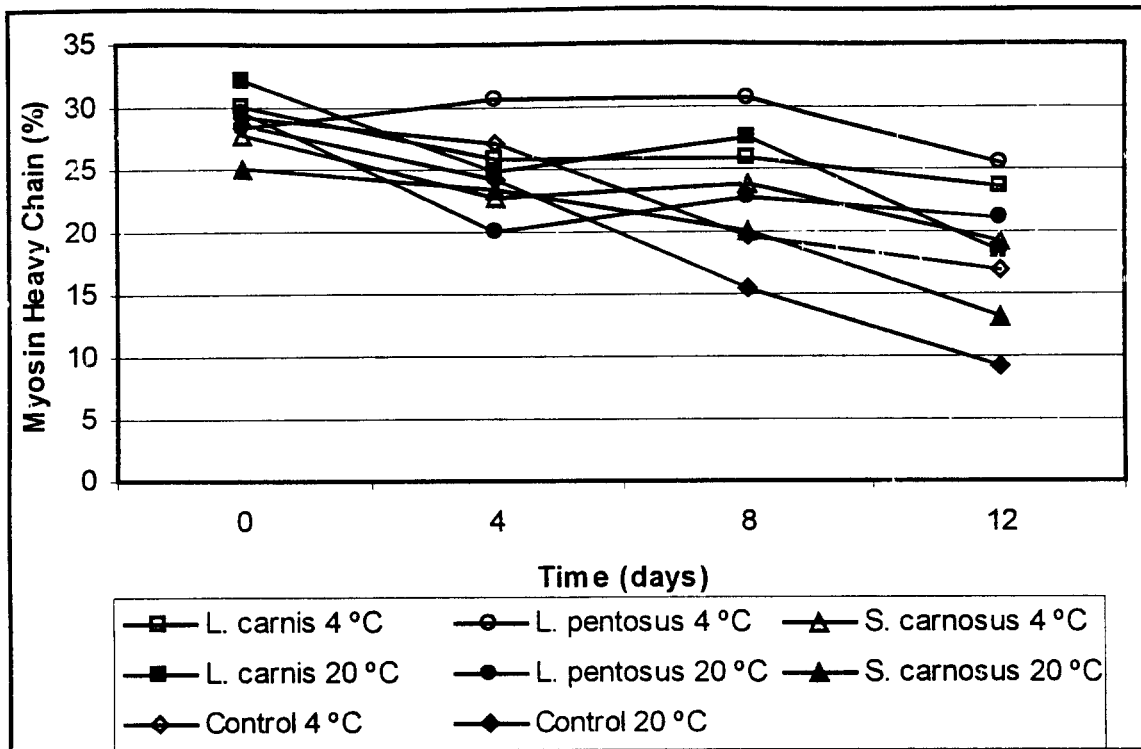


Figure 9

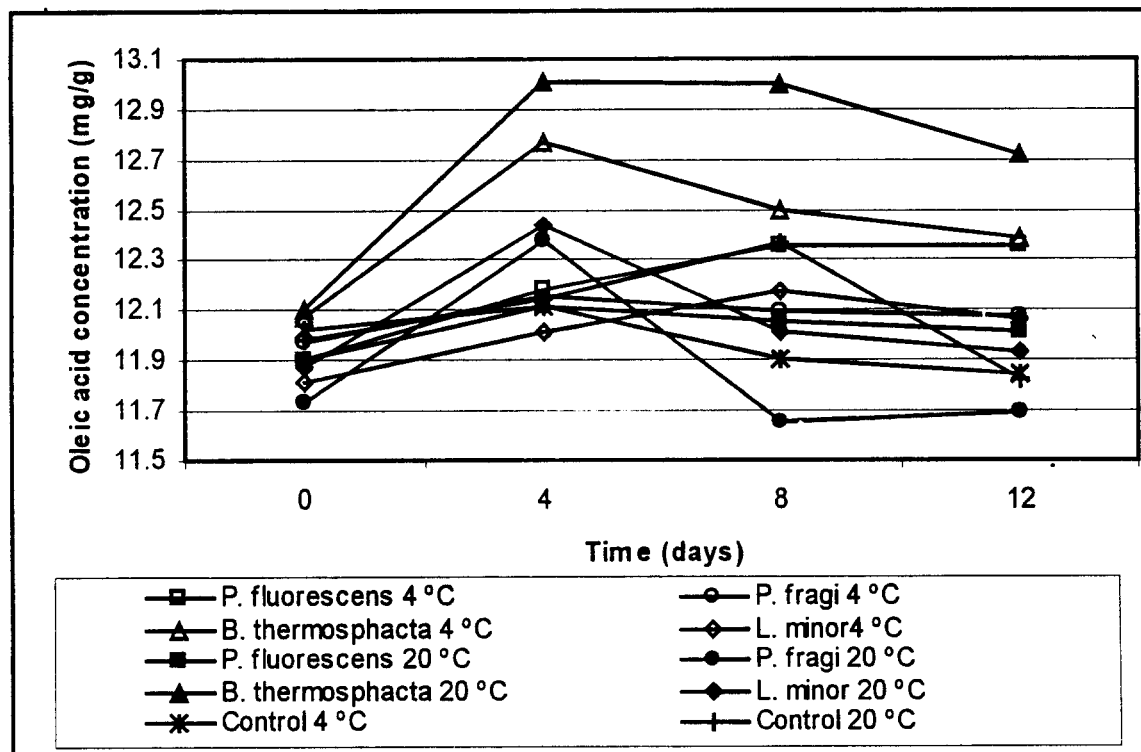


Figure 10

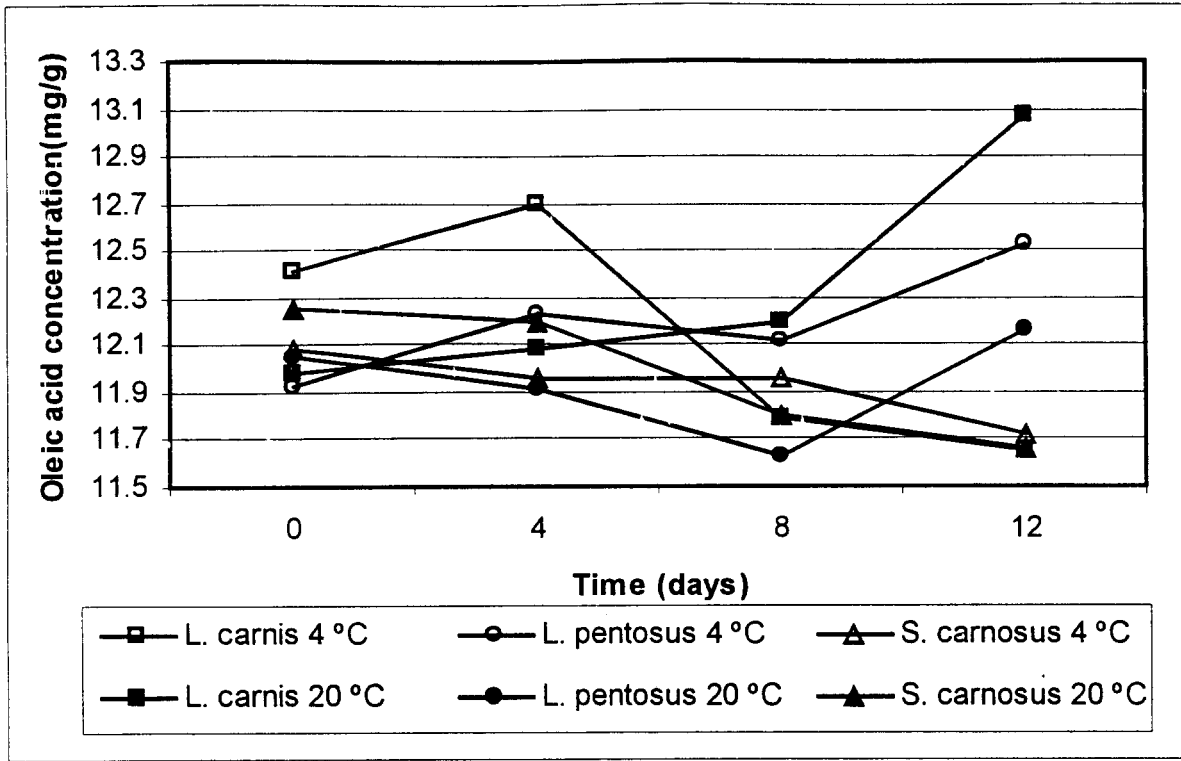


Figure 11