

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN**



**INFORME FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

“**MODELAMIENTO DE LA BIOCONSERVACIÓN DE LA  
HAMBURGUESA DE CARNE POR PRODUCTOS  
ORGÁNICOS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS  
HOMOFERMENTATIVAS**”

**AUTOR: EDGAR ZÁRATE SARAPURA**

**(PERIODO DE EJECUCIÓN: Del 01 de mayo de 2019  
al 30 de abril de 2020)**

**(Resolución de aprobación N° N° 589-2019-R )**

**Callao, 2020**



## DEDICATORIA

A Dios, a mi familia y a mis maestros, que siempre me brindan el apoyo y entusiasmo para seguir conociendo la complejidad de la naturaleza, brindándome la fe, sentimientos y el conocimiento sin egoísmo.

## AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todos sus consejos a poder entender y comprender las ciencias puras en el entorno del modelamiento matemático como herramienta de la Microbiología predictiva.

Reconocer y agradecer al Mg. Roel Vidal Guzmán por las facilidades y apoyo efectivo en la implementación del laboratorio experimental del futuro Centro de Investigación en Modelamiento Matemático de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática; ambiente en el cual se ejecutó el presente proyecto de investigación.

Mi agradecimiento a la Bch. Ing. Química Sandra Altamirano Berrocal quien colaboró en la aplicación de los métodos para la obtención de las curvas de crecimiento, tarea muy compleja, que requiere de mucha dedicación y precisión para poder aplicar el modelamiento matemático.

Agradecer la Sra. Susana Raquel Rivas Huash, por su apoyo en la gentil gestión administrativa de la documentación de éste y otros proyectos anteriores, insistiendo en la cabal aplicación de las formas y contenidos de las normas y reglamentos que se aplican a los proyectos de investigación.

Agradecer al Vice rectorado de Investigación, de la Universidad Nacional del Callao, que a través del Fondo Especial de Desarrollo Universitario (FEDU) permitió financiar, en parte, la ejecución del presente proyecto.

# ÍNDICE

	N°
	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
1.1. Descripción de la realidad problemática	5
1.2. Formulación del problema	7
1.2.1. Problema General	7
1.2.1. Problemas Específicos	7
1.3. Objetivos	7
1.3.1. Objetivo General	7
1.3.2. Objetivos Específicos	7
1.4. Limitantes de la Investigación	8
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	9
2.1. Antecedentes	9
2.1.1. Internacionales	9
2.1.2. Nacionales	12
2.2. Marco	13
2.2.1. Teórico	13
2.2.2. Conceptual	14
2.3. Definición de términos básico	17
CAPÍTULO III: HIPÓTESIS Y VARIABLES	24
3.1. Hipótesis	24
3.1.1. Hipótesis General	24
3.1.2. Hipótesis Específicas	24
3.2. Definición conceptual de variables	26
3.3. Operacionalización de variables	26
CAPÍTULO IV: DISEÑO METODOLÓGICO	27
4.1. Tipo y diseño de la investigación	27
4.2. Método de investigación	27
4.3. Población y muestra	28

4.4.	Lugar de estudio y periodo desarrollado	29
4.5.	Técnicas e Instrumentos para la recolección de la información	29
4.6	Análisis y procesamiento de datos	32
CAPÍTULO V: RESULTADOS		33
5.1.	Resultados descriptivos	33
5.2.	Resultados inferenciales	36
CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS		47
6.1	Contrastación y demostración de la hipótesis con los resultados	47
6.2	Contrastación de los resultados con otros estudios similares.	48
6.3.	Responsabilidad ética	87
CONCLUSIONES		88
RECOMENDACIONES		88
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		89
ANEXOS		99

## INDICE DE TABLAS DE CONTENIDO

		N° Página
Tabla 1	Calidad microbiológica de las hamburguesas de los tratamientos experimentales: Control, Bacterias ácido lácticas, Lactosuero y Nisina; sin adición de los productos orgánicos de las bacterias ácido lácticas homofermentativas	35
Tabla 2	Porcentaje de Humedad y pH presente en las hamburguesas de carne destinadas a cada tratamiento sin adición de los productos orgánicos de las bacterias ácido lácticas homofermentativas.	36
Tabla 3	Efecto de la concentración de 3 Log UFC/g y 6 Log UFC/g de bacterias ácido lácticas (BALHF) sobre los parámetros cinéticos del crecimiento de bacterias mesófilas aerobias (MA) en hamburguesas de carne conservadas a 4°C	39
Tabla 4	Efecto de la concentración de ácido láctico 1.25% y 2.5 % del suero lácteo sobre los parámetros cinéticos del crecimiento de bacterias mesófilas aerobias (BMA) en hamburguesas de carne conservadas a 4°C	42
Tabla 5	Efecto de la concentración de ácido láctico 1.25% y 2.5 % del suero lácteo sobre los parámetros cinéticos del crecimiento de bacterias mesófilas aerobias (BMA) en hamburguesas de carne conservadas a 4°C	43

Tabla 6	Velocidad de crecimiento $\mu_{\max}$ (Log UFC/g/h) en relación a la temperatura ( $^{\circ}$ K) y Tiempo (día) por cada producto orgánico de las BALHF obteniendo una correlación entre 0.953 y 0.98.	45
Tabla 7	Efecto de las temperaturas de abuso: 288, 293 y 303 $^{\circ}$ K, sobre el crecimiento de bacterias mesófilas aerobias para la obtención de los parámetros del modelo matemático de Arrhenius	46
Tabla 8	tiempo de vida útil de las hamburguesas de carne tratadas con productos orgánicos de bacterias ácido lácticas homofermentativas conservadas a 4 $^{\circ}$ C en relación a su concentraciones óptimas-	47

## INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1	37
Efecto de la concentración de células activas de BALHF 3 y 6 Log UFC/g sobre el crecimiento de BMA en hamburguesas de carne.	
Figura 2	38
Crecimiento de mesófilos aerobios (MA) Log UFC/g en hamburguesas de carne tratadas con Bacterias ácido lácticas homofermentativas (BALHF) a concentraciones de 3 y 6 Log UFC/g	
Figura 3	41
tiempo de vida útil de las hamburguesas de carne tratadas con productos orgánicos de bacterias ácido lácticas homofermentativas conservadas a 4°C en relación a su concentraciones óptimas-	

## RESUMEN

La principal característica de las hamburguesas de carne es su rápido deterioro debido principalmente a su carga microbiana presente desde un inicio de su elaboración y sobrevive a 4 °C durante su conservación. El objetivo del estudio fue lograr la Bioconservación de hamburguesas de carne artesanal mediante la incorporación de productos orgánicos de bacterias ácido lácticas homofermentativas, asistido por modelos matemáticos de Baranyi & Robert y Arrhenius. Se elaboraron curvas de crecimiento de bacterias mesófilas aerobia (BMA) presentes en forma natural en las hamburguesas que contienen los biopreservantes como células activas de Bacterias ácido lácticas homofermentativas; Suero Lácteo y Nisina (NIS). Las curvas de crecimiento se ajustaron con el modelo de Baranyi & Roberts obteniendo las: velocidades de crecimiento ( $\mu_{max}$ ). El tiempo de vida útil se calculó utilizando la velocidad de crecimiento a temperaturas de abuso que fue la base del uso del modelo secundario de Arrhenius. El tiempo de la vida útil de las hamburguesas conservado a 4 °C, según el modelo de Arrhenius y de acuerdo al bioconservante utilizado y fue de diferente magnitud en relación al tratamiento sin bioconservante. La mejor respuesta sobre biopreservación es por el uso del suero lácteo desproteinizado con 2.5% de ácido láctico, que permite una extensión de vida útil de 33.75 días, conservándose a 4 °C, en condiciones de inocuidad.

Palabras Claves: Biopreservación de alimentos, Hamburguesas de carne, microorganismos mesófilos aerobios, microbiología predictiva.

## **ABSTRACT**

The main characteristic of meat patties is their rapid deterioration mainly due to their microbial load present from the beginning of their preparation and survives at 4 ° C during preservation. The objective of the study was to achieve the Bioconservation of artisan meat patties by incorporating organic products from homofermentative lactic acid bacteria, assisted by mathematical models from Baranyi & Robert and Arrhenius. Growth curves of aerobic mesophilic bacteria (BMA) naturally present in hamburgers containing biopreservatives as active cells of homofermentative lactic acid bacteria were made; Milk Serum and Nisin (NIS). The growth curves were adjusted with the Barangy & Roberts model obtaining the: growth rates ( $\mu_{max}$ ). Pot life was calculated using the growth rate at abuse temperatures that was the basis for the use of the Arrhenius secondary model. The shelf life time of hamburgers kept at 4 ° C, according to the Arrhenius model and according to the bioconservative used and was of different magnitude in relation to the treatment without bioconservative. The best answer on biopreservation is for the use of the whey deproteinized with 2.5% of lactic acid, which allows an extension of useful life of 33.75 days, keeping at 4 ° C, under safe conditions.

Key Words: Biopreservation of food, meat patties, aerobic mesophilic microorganisms, predictive microbiology.

## INTRODUCCIÓN

Las hamburguesas actualmente tienen un elevado consumo en todos los estratos sociales y muchas veces es el principal sustento alimentario durante el día; sin embargo su principal problema es su rápido deterioro aun cuando su conservación es a bajas temperaturas; así mismo, pueden constituir un vehículo para la propagación de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) (Bhandare y col., 2007; Podpečan y col., 2007).

La presente investigación está referido a la bioconservación de las hamburguesas utilizando productos orgánicos provenientes de bacterias ácido lácticas homofermentativas, los cuales ejercieron un control del crecimiento cinético de las bacterias mesófilas aerobias (BMA) sobrevivientes a los efectos del proceso de elaboración y almacenamiento en temperaturas de refrigeración.

La principal característica de las hamburguesas es el tiempo corto de conservación a consecuencia de su pronta alteración debido principalmente a su carga microbiana presente desde un inicio de su elaboración.

La alteración empieza como resultado de las actividades metabólicas microbianas, reacciones enzimáticas tisulares y modificación de sus propiedades físicas. Si no se controla estas acciones, la carne molida en poco tiempo se transformaría en un producto no apto para el consumo humano. En consecuencia es necesario controlar la actividad microbiana evitando, en lo posible, el deterioro y de ésta forma extender el tiempo en el cual la hamburguesa todavía posee un nivel de calidad sanitaria para ser aceptable para el consumo humano.

De los factores externos el más importante para el crecimiento de las bacterias es la temperatura, de tal forma que la temperatura seleccionada para su conservación en refrigeración determina el tipo de bacteria que todavía es capaz de multiplicarse en tales condiciones, como es el caso de las bacterias psicrófilas

o psicrotrofas. Estos microorganismos en su mayoría son Gram positivos, aerobios estrictos y capaces de crecer a temperaturas próximas a 0°C

La investigación de ésta problemática se realizó por el interés de conocer el comportamiento de las bacterias mesófilas aerobias presentes en las hamburguesas a través de las diferentes etapas de su crecimiento, debido a que se observa que éste producto se elabora artesanalmente con o sin criterios de inocuidad y su almacenamiento no respeta las exigencias de la temperatura de refrigeración a 4 °C. Por otro lado, técnicamente la producción de tipo artesanal ha sufrido un escalamiento de tipo industrial con cambios en su formulación y la incorporación de aditivos químicos para satisfacer las necesidades de su producción; sin embargo, el enfoque de la seguridad alimentaria exige nuevas alternativas tecnológicas que eviten el uso de conservadores químicos.

La investigación consideró tres grupos experimentales de hamburguesas, cada uno con dos niveles de producto orgánico: Células de Bacterias ácido lácticas homofermentativas (BALHF)  $10^3$  y  $10^6$  UFC/mL(BALHF), lactosuero 1.25 y 2.5% (LS) y Nisina 400 y 800 ppm (NIS), conservadas a 4°C.

Para cada tratamiento se elaboraron curvas del crecimiento de las BMA en presencia del producto orgánico o bioconservante, relacionando el Log UFC/g diario, en función del tiempo. Los parámetros cinéticos que describen el crecimiento se obtuvieron mediante el modelo matemáticos primario de Baranyi & Roberts, el cual reportó la población inicial y final, la fase de latencia, fase logarítmica y tiempo generacional. Para la determinación del tiempo de vida útil se obtuvieron curvas de crecimiento de la BMA a 15, 25 y 35 °C por un periodo de 10 días, en hamburguesas con el producto orgánico con mayor impacto. haciendo uso del modelo de Baranyi & Roberts se obtuvo la velocidad del crecimiento ( $\mu_{max}$ ) correspondiente a cada temperatura y de ésta forma estimar los parámetros del Modelo de Arrhenius, permitiendo calcular la Energía de activación ( $E_a$ ) y Ln A del crecimiento de las BMA. Finalmente se obtiene el tiempo de vida útil de las hamburguesas de carne a 4 °C.

Los resultados demostraron que los productos orgánicos de bacterias ácido lácticas homofermentativas tienen control del crecimiento de las bacterias mesófilas aerobias, destacando que el mayor impacto corresponde al lactosuero 2.5% el cual permite una extensión de la vida útil para las hamburguesas por un periodo de tiempo de 33 días, conservadas a 4 °C, con un nivel de carga microbiana menor de 6.0 Log UFC/g, con característica de ser apta para consumo humano.

## **CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### 1.1. Descripción de la realidad problemática

La carne fresca es el principal insumo para la elaboración de las hamburguesas, debido a su  $A_w$  y pH, y riqueza de nutrientes, constituye un excelente medio de cultivo para gran número de microorganismos como *Enterococcus* y *Clostridium* que producen gas y hacen a la carne blanda y esponjosa, o la *Clostridium botulinum* altamente patógena. De igual manera, se producen aminas (Putrescina, cadaverina), características del desagradable olor de carne en estado de descomposición y que producen una toxicidad elevada.

También interviene la humedad de la superficie y la temperatura en la que se almacena la carne, así como las condiciones de higiene y seguridad de manejo previo al sacrificio y los tratamientos que se realicen hasta llegar al consumidor.

Los organismos que se encuentran en la carne tienen una temperatura óptima para su crecimiento y el frío es efectivo para reducir la velocidad a la cual se efectúa la respiración, por lo que las bajas temperaturas son importantes en la conservación de la carne por corto tiempo retardando el crecimiento de muchos microorganismos, causantes de su descomposición, aun así existen bacterias psicrófilas y psicrotrofas que a bajas temperaturas pueden desarrollar su crecimiento.

La conservación de la carne para la preparación de la hamburguesa se requiere un ambiente controlado menor a 4° C. La carne debe mantenerse fresco con esta temperatura; sin embargo, la posibilidad de que se desarrollen microorganismos será muy baja, aunque esto no significa que sean eliminados, porque se pueden activar cuando la temperatura aumenta, ya que el crecimiento es retardado, no detenido sobre todo cuando las bacterias tienen capacidades de adaptación al frío.

La zona de peligro para el crecimiento microbiano en las hamburguesas se encuentra entre los rangos de temperatura de 5.0°C a 60 °C (FDA o Food and Drug Administration), es importante mencionar que en este caso, la carne o las hamburguesas no deben estar sin consumir más de veinticuatro horas,

La transformación de la carne entera a molida aumenta la capacidad de su deterioro y en consecuencia de las hamburguesas. La superficie de contacto del músculo con el oxígeno ambiental se incrementa, por esta razón el tiempo de conservación de la misma es reducido. Por otro lado, ocurren transformaciones estructurales a nivel celular que benefician el desarrollo de microorganismos alteradores, elevando la posibilidad de contaminación debido a la gran manipulación que sufre durante el proceso de elaboración.

El tiempo de almacenamiento de las hamburguesas también es uno de los factores determinantes para la proliferación de microorganismos. Entre más largo sea este tiempo, mayor riesgo para el alimento de tener proliferación microbiana. La alteración es reconocible por la actividad que los microorganismos ejercen sobre los alimentos. Para que se desarrollen bacterias y otros microorganismos, requieren de condiciones favorables aportadas por los factores intrínsecos y extrínsecos de las hamburguesas.

## 1.2. Formulación del problema

### 1.2.1. Problema general

¿De qué forma se puede controlar la alteración bacteriana de la hamburguesa de carne artesanal y evitar la pérdida de su vida útil durante su almacenamiento?

### 1.2.2. Problemas específicos

- ¿Cuáles son las características físico químico y microbiológicas de las hamburguesa elaborada artesanalmente?
- ¿Qué aditivo orgánico natural es posible obtener y utilizarlo para controlar a las bacterias alterantes presentes en la hamburguesa elaborada artesanalmente para su conservación en condiciones inocuas?
- ¿Cuáles son las concentraciones óptimas de un aditivo orgánico natural que se puedan ser utilizadas para el control de las bacterias mesófilas aerobias presentes en la hamburguesa elaborada artesanalmente para su conservación en condiciones inocuas?
- ¿Cómo influye la aplicación de tratamientos con productos orgánicos sobre el tiempo de vida útil de las hamburguesas elaboradas artesanalmente?

## 1.3. Objetivos

### 1.3.1. Objetivo general

Determinar las condiciones de conservación de la hamburguesa utilizando productos orgánicos provenientes de bacterias ácidolácticas homofermentativas

### 1.3.2. Objetivos específicos

- Evaluar los parámetros físicos-químicos y microbiológicos de las Hamburguesas en estado fresco.

- Determinar el efecto de la concentración de bacterias ácido lácticas homofermentativas sobre la cinética del crecimiento de bacterias alterantes para la conservación de las hamburguesas elaboradas artesanalmente.
- Determinar el efecto de la cantidad del extracto crudo del cultivo de bacterias ácido lácticas probióticas homofermentativas, en suero de leche sobre la cinética del crecimiento de bacterias alterantes, para la conservación de las hamburguesas elaboradas artesanalmente.
- Determinar el efecto de la concentración de Nisina sobre la cinética del crecimiento de bacterias alterantes, para la conservación de las hamburguesas elaboradas artesanalmente.
- Determinar la vida útil de hamburguesas elaboradas artesanalmente tratadas con productos orgánicos provenientes de bacterias ácido lácticas homofermentativas.

#### 1.4 Limitantes de la investigación

El estudio se realizó en hamburguesas de carne, considerando una carga bacteriana representada por microorganismos mesófilos aerobios considerados como los principales alterantes del producto. Teóricamente las células bacterianas que sobrevivieron al proceso de elaboración fueron las que determinaron el tiempo de vida útil. Así mismo, la calidad y variedad de microorganismos sobrevivientes al proceso de elaboración estuvo por debajo del límite menor permisible otorgada por la norma nacional. Estas circunstancias establecen que la Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA) son el más persistente y de fácil manejo en el laboratorio y de crecimiento en medios de cultivo sintético en los cuales no existen límites nutricionales a diferencia de los que se puedan presentar en las hamburguesas. Además son consideradas como indicador de contaminación cruzada.

El estudio se realizó hasta un tiempo en el que no se observó la pérdida de inocuidad al no alcanzar una carga microbiana de 7 Log UFC/g. El tipo de hamburguesa que se estudió, provino de la zona de Lima adquirida de un supermercado, debido a que sus productos que expenden tienen registro sanitario por la autoridad pertinente.

Espacialmente el estudio utilizó la infraestructura del laboratorio de ciencias naturales equipado para realizar pruebas de microbiología y de equipos de computación para desarrollar simultáneamente el registro de la actividad de crecimiento de las bacterias presentes en las hamburguesas y el desarrollo del modelamiento respectivo que es monitoreado por una computadora.

## **CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO**

### 2.1 Antecedentes

#### 2.1.1. Internacional

La conservación de los productos cárnicos siempre ha sido una preocupación de todas las sociedades antiguas y modernas aplicando tecnologías de deshidratación y congelación manteniendo sus propiedades nutritivas y en algunos casos se aplicaron técnicas de maceramiento con la finalidad de lograr una ligera desnaturalización de las proteínas en combinación con procesos de fermentación. Los microorganismos que son utilizados para procesos fermentativos son las levaduras y las bacterias ácido lácticas (BAL), siendo estas últimas las que además de aportar enzimas fermentativas forman moléculas con actividad biológica que pueden controlar microorganismos alterantes o patógenos.

Las BAL se caracterizan por crecer favorablemente sobre sustratos proteícos en mezcla con carbohidratos realizando un metabolismo sinérgico, Cury et. al “evaluaron el proceso de fermentación del lactosuero ácido (entero y desproteinizado) con *Lactobacillus casei*, sometiéndole a fermentación

anaeróbica a 37°C y 120 rpm por 96 h. Los valores de acidez fueron superiores a 120 Grados Dornic (120°D), mostrando la mayor producción (20.83gAL/l),  $Y'p/s=0.86$ ,  $Qp=0.173gAL/l*h$ ; en suero entero; mientras el lactosuero desproteinizado mostró un mayor crecimiento microbiano, menor conversión de lactosa (8.2%) y menor producción media de ácido láctico (8.19g/l)".

Los estudios de conservación utilizando microorganismos probióticos pueden ser condicionados por los niveles de población utilizado en relación con bajas temperaturas. Así tenemos que "la bioconservación de carne de res (chuleta) con *Lactobacillus acidophilus* sobre *Salmonella spp*, variando la temperatura, concentración del *Lactobacillus acidophilus* y *Salmonella spp*. se demostró que las concentraciones  $10^6$ UFC/g y  $10^7$ UFC/g de *Lactobacillus acidophilus* inhiben el crecimiento de *Salmonella spp*. Para la concentración  $10^6$ UFC/g la temperatura óptima es entre 0 a 4 °C (congelación) y para la concentración  $10^7$ UFC/g es entre 4 a 8 °C, refrigeración". (Garcia & Sandoval , 2015)

Jurado y col. (2017) determinaron el efecto del sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus lactis* en lomo de cerdo. Utilizaron (500 µl) del sobrenadante en 50 g de lomo, de testigos usaron ácido láctico (2 %) y suero fisiológico (sin aditivo). Evaluaron cada tratamiento a 4 y 20 °C por 15 días y realizaron análisis sensorial y microbiológico. Obtuvieron mejores resultados a la temperatura de 4 °C. Los coliformes totales, Clostridium sulfito reductor y pH no mostraron diferencia en el factor aditivo ( $p > 0,05$ ), pero coliformes fecales, acidez y capacidad de retención de agua (CRA), sí ( $p < 0,05$ ). Por lo que concluyen que el sobrenadante de *L. plantarum* conserva mejor el lomo de cerdo; además, mantiene las características organolépticas y evita el crecimiento microbiano. Mientras que *L. lactis* mostró resultados similares al ácido láctico y por encima del tratamiento sin aditivo. (Jurado y col., 2017).

Moreno (2012) estudió la reducción de carga microbiana en la carne de pollo mediante el uso de bactericidas orgánicos: el ácido láctico y la Nisina, para lo elaboró varias soluciones con ácido láctico al 1% y 2% y nisina con 300 y 500

ppm, en combinación con el tiempo de inmersión de 5 y 10 minutos, con una temperatura de almacenamiento de 4 y 18 °C. Se determinó que el mejor tratamiento es al 1% de ácido láctico, 500 ppm de nisina por un tiempo de inmersión de 10 minutos a una temperatura de refrigeración de 4°C, tratamiento que extiende el tiempo de vida útil del producto a 14 días, reduciendo el 99.25% de microorganismos aerobios y el 99.30% de coliformes totales, retardando el crecimiento de E.coli. También, observó que el tratamiento afectó a tres parámetros: la textura, sabor y aceptabilidad mientras que el color y olor no tienen diferencia significativa (Moreno, 2012)

La producción biotecnológica de ácido láctico ofrece varias ventajas como el bajo costo de los sustratos, bajas temperaturas de producción y bajo consumo de energía (Rojan et al. 2007). Las recientes investigaciones están enfocadas en encontrar nuevas y efectivas fuentes nutricionales y nuevas técnicas de fermentación encaminadas a alcanzar altas conversiones de sustrato y altos rendimientos en ácido láctico (Sule et al. 2004). Esta revisión se enfoca en las distintas tecnologías de fermentación para producir ácido láctico a partir de los microorganismos, las materias primas renovables, los sistemas de fermentación evaluados y las herramientas estadísticas de los análisis usadas para optimizar el proceso biotecnológico de producción de éste.

Vásquez , Suárez , & Montoya (2009) Evaluaron la extensión de la vida útil de filetes de carne solomo redondo (*longissimus dorsi*) en refrigeración, mediante la aplicación de extracto crudo de bacteriocinas producido por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y el ácido láctico. La carne se almacenó a 3° C durante 12 días se analizaron microbiológicamente, pH, textura, pérdidas de peso y sensorial. En coliformes totales el mejor tratamiento fue con extracto crudo de bacteriocinas, observándose un comportamiento bactericida durante los tres primeros días, en el caso de microorganismos fecales el extracto crudo de bacteriocinas impidió el desarrollo de colonias fecales en niveles superiores a 1.5 log NMP/g..

### 2.1.2 Nacional

A nivel nacional en la actualidad estas investigaciones están orientadas hacia criterios tecnológicos que se fundamenta en los análisis fisicoquímicos y sensoriales; por otro lado, desde el punto de vista microbiológico los estudios son de tipo descriptivos y basados en el contexto de las normas. Referente a la calidad microbiana de las hamburguesas normalmente éstas se encuentran referenciados con una carga de mesófilos elevada y en muchos casos con ausencia de patógenos.

Sobre la conservación de productos cárnicos con BAL tenemos los estudios de Quispe (2017), quien “evaluó la conservación de la carne de ovino de raza *Corriedale* con Bacterias ácido lácticas (*Lactococcus lactis* y *Lactobacillus bulgaricus*) envasado al vacío, variando la temperatura en (5, 15 y 25)°C con una concentración de bacterias ácido lácticas (0.000, 0.025 y 0.050%). Como resultado encontró, que, la temperatura afectó significativamente a las propiedades fisicoquímicas (acidez, pH, variación total del color) ,las bacterias ácido lácticas, coliformes totales y *Pseudomona aeruginosa*. Mientras que a una concentración de 0.050% de bacterias ácido lácticas a una temperatura de 5°C se obtuvo mayor tiempo de vida útil 19.71 días, incrementándose en 6 días con respecto a la muestra control (Quispe, 2017).

Son diversos los tipos de aditivos orgánicos purificados que se pueden utilizar para la conservación de alimentos, como lo presentado por Cáceda (2018) quien “evaluó el efecto de la concentración de nisina sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* ATCC 19114 en carne de res cruda. Utilizó carne de res cruda que fueron tratadas con 500 UI/g, 1000 UI/g y 1500 UI/g de nisina, luego inoculó  $10^7$  UFC/g de *L. monocytogenes* ATCC 19114 y se incubaron a 4 °C por 5 días y a 37 °C por 36 horas. El crecimiento de *L. monocytogenes* en los grupos tratados con 1000 UI/g y 1500 UI/g fue significativamente inhibitor (P <0.05) en comparación con el grupo control. El grado de inhibición aumentó con el aumento de la concentración de nisina y la disminución de la temperatura de incubación”.

Otra forma de utilizar aditivos orgánicos son los sobrenadantes de cultivos de bacterias lácticas, que en su contenido existen sustancias con actividad antimicrobiana. Abad y Llenque (2014) evaluaron “el efecto bactericida del sobrenadante del cultivo de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* sobre la supervivencia de *Salmonella typhi*. Los resultados evidencian una disminución de las unidades formadoras de colonias (UFC/mL) de *S. typhi* hasta las 24 h de evaluación en condiciones de refrigeración. Por lo que concluye que el sobrenadante de *B. animalis* subsp. *lactis* sí afecta la supervivencia de *S. typhi* en las condiciones de ensayo”

## **2.2. Marco**

### **2.2.1. Teórico**

La vida útil de los productos cárnicos depende de diversos factores, como la calidad de la carne, ingredientes, aditivos, agua empleada en su producción y la limpieza de equipos (Hernandez et al, 2013). Su conservación en frío no se puede interrumpir posterior a su producción durante el almacenamiento, transporte, distribución y venta. Estas operaciones son quizá las actividades más importantes que puede afectar la estabilidad biológica de los mismos. (Cayré et al., 2003; Cabeza-Herrera et al., 2006; Kreyenschmidt et al., 2010; Feng et al., 2014).

Se reconoce que las bacterias ácido lácticas (BAL), reconocidas como iniciadoras en procesos fermentativos industriales o prebióticos, pertenecen a un grupo de microorganismos anaerobios facultativos heterogéneo (García-Parra et al., 2011, Sánchez-Zapata et al., 2013), y algunas son resistentes al calor y distribuidos en el medio ambiente (Hongpattarakere et al., 2013) “que pueden crecer a temperaturas de refrigeración y debido al metabolismo bioquímico homo y heterofermentativo inducir la acumulación de ácidos orgánicos que pueden estimular el crecimiento de levaduras”. Las BAL pueden sobrevivir a los procesos térmicos de pasteurización (Cabeza-Herrera et al., 2006) y, cuando los productos cárnicos se almacenan en condiciones de refrigeración y microaerófilas, pueden multiplicarse debido a la alta actividad de agua, la baja concentración de

oxígeno y un ambiente ácido que crean condiciones más favorables para su crecimiento (Cayré et al., 2005; Slongo et al., 2009).

Se ha demostrado que existe actividad biológica de los compuestos orgánicos presentes en los sustratos utilizados por las BAL sobre microorganismos alterantes o patógenos cuando se le utiliza como aditivo conservador. Así tenemos estudios que demuestran que “existe efecto del extracto crudo de metabolitos mostró que es capaz de prolongar el periodo de vida útil de la carne de res empacada en atmosfera modificada por aproximadamente 2 días, disminuyó en dos unidades logarítmicas los recuentos de la microbiota acompañante, de microorganismos causantes de deterioro como Pseudomonas, BAL, mesófilos y psicrófilos, además de mantener el pH y las características sensoriales en un rango aceptable. (Vanegas, Ossa, Gardeazábal, & Coral, 2011)

La utilidad de realizar estudios sobre las propiedades de las BAL para aplicarlas en la conservación de alimentos en lugar de aditivos químicos es una contribución a tener un producto más inocuo, no solamente desde un punto de vista químico, sino también microbiológico al eliminar a bacterias patógenas. La cuantificación de los productos orgánicos bacterianos repercutirá sobre la industria cárnica al lograr alimentos inocuos. Es un aspecto poco estudiado aun, y constituye un campo interesante de investigación para el desarrollo de productos más seguros, enriquecidos en sabor de forma más natural, o con propiedades funcionales.

### **2.2.2. Conceptual**

Crecimiento microbiano

La relación entre la tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ) de una población de microorganismos y la concentración de sustrato (S) es una herramienta valiosa para la cinética de microorganismos. Esta relación representa las leyes de velocidad derivadas empíricamente que se refieren como modelos teóricos.

Estos modelos no son más que expresiones matemáticas generadas para describir el comportamiento del sistema generado. Los modelos clásicos, que se

han aplicado al crecimiento de la población microbiana, incluyen el modelo de Verhulst y la función de Gompertz (ecuación 1).

#### Modelos de crecimiento microbiano

El modelamiento del crecimiento microbiano se realiza usualmente en dos pasos. En primer lugar, la relación entre el tamaño de la población microbiana (N) y el tiempo (t) se describe a través de un modelo matemático (modelo primario). En un segundo paso, la relación entre los parámetros del modelo primario y las condiciones ambientales se describe a través de un segundo modelo matemático (modelo secundario).

Los datos de crecimiento para cada temperatura fueron ajustados mediante análisis de regresión no lineal al modelo primario de Baranyi (Baranyi y Roberts, 1994) usando el software DMFit 2.1 para obtener los parámetros cinéticos: fase de latencia ( $\lambda$ ), velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) y máxima densidad poblacional ( $N_{\max}$ ). El modelo de Baranyi se define mediante la ecuación 1:

$$\ln(N(t)) = \ln(N_0) + \mu_{\max}A(t) - \ln\left[1 + \frac{e^{\mu_{\max}A(t)} - 1}{e^{(N_{\max} - N_0)}}\right] \quad (1)$$

Donde  $\ln(N(t))$  es el log de la concentración celular al tiempo t [d(día)] (UFC/g);  $\ln(N_0)$  es el log de la concentración celular inicial (UFC/g);  $\mu_{\max}$  es la velocidad de crecimiento exponencial (log UFC/g día);  $\ln(N_{\max})$  es el log de la concentración celular final (UFC/g); y A es un parámetro que representa el aumento logarítmico de la población relacionado al estado fisiológico celular, y se determina mediante la ecuación 2:

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln(e^{\mu_{\max}t} + e^{-\mu_{\max}\lambda} - e^{-\mu_{\max}(t+\lambda)}) \quad (2)$$

El modelo propuesto por Baranyi y Roberts (1994), descrito en la ecuación (2), es uno de los más extendidos para el modelado del crecimiento microbiano en la actualidad. Este modelo describe el crecimiento como una cinética de primer orden de ratio  $\mu(t)$ , que varía en función de las condiciones ambientales y según la fase en que se encuentre la población. Durante la fase exponencial este

coeficiente es igual a  $\mu_{max}$ , mientras que durante las fases de adaptación y estacionaria se reduce por medio de los coeficientes  $\alpha(t)$  y  $\gamma(t)$ , ambos comprendidos entre cero y uno.

$$\frac{dN}{dt} = \alpha(t) \cdot \mu_{max} \cdot \gamma(t) \cdot N(t) \quad (3)$$

En este modelo se describe la fase de adaptación asumiendo que existe una sustancia ficticia  $P(t)$  que hace de cuello de botella. El crecimiento de esta sustancia sigue una cinética de Michaelis-Menten, lo que se ve reflejado en el parámetro  $\alpha(t)$  tal y como define la ecuación (3).

$$\alpha(t) = \frac{P(t)}{K_p + P(t)} = \frac{P(t)/K_p}{1 + P(t)/K_p} = \frac{Q(t)}{1 + Q(t)} \quad (4)$$

La variable  $Q(t)=P(t)/k_p$ , sin significado microbiológico, caracteriza el estado fisiológico de la célula. Esta variable crece exponencialmente a lo largo del experimento con ratio  $v$ , tal y como se describe en la ecuación (4).

Usualmente se considera que  $v = \mu_{max}$  para reducir la complejidad del modelo.

$$\frac{dQ}{dt} = v \cdot Q(t) \quad (5)$$

La fase estacionaria se modela a través del parámetro  $\gamma(t)$ , que introduce una regulación interna de la población de manera que no puede exceder un valor determinado ( $N_{max}$ ), tal y como se muestra en la ecuación (5).

$$\gamma(t) = \left(1 - \frac{N(t)}{N_{max}}\right)^m \quad (6)$$

El parámetro  $m$  define la suavidad de la transición entre la fase exponencial y la estacionaria. Este parámetro se suele considerar igual a la unidad. Pese a su clara intención mecanística, no existe una manera de determinar a priori la sustancia  $Q(t)$ , de manera que tiene que aproximarse a partir de datos experimentales. Además, Alavi et al (1999) observaron que este parámetro no siempre se mantiene constante para poblaciones con idéntica historia de conservación. Mellefont and Ross (2003) dedujeron que la hipótesis de Baranyi de que el parámetro  $Q(t)$  sólo depende de las condiciones de pre-inoculación es válido solamente para incrementos bruscos de temperatura (no para reducciones).

La ecuación de Arrhenius es una expresión matemática que se utiliza para comprobar la dependencia de la constante de velocidad (o cinética) de una reacción con la temperatura a la que se lleva a cabo esa reacción, de acuerdo con esta ecuación:

$$k(T) = A \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (7)$$

Donde  $k(T)$  = constante cinética (dependiente de la temperatura);  $A$  = Factor pre exponencial;  $E_a$  = Energía de Activación;  $R$  = Constante universal de los gases;  $T$  = Temperatura absoluta (°K)

Según esta ecuación,  $k$  aumenta de modo exponencial cuando aumenta la temperatura. En ella aparecen dos parámetros: La energía de activación ( $E_a$ ) esta relacionada con la barrera de energía que deben superar los reactivos para transformarse en productos, por lo que un valor elevado de la misma provoca un valor reducido de  $k$  y por lo tanto de  $v$ . Sus dimensiones son de energía por cada mol y el factor pre exponencial factor de frecuencia  $A$  tiene las mismas unidades que  $k$ . La ecuación de Arrhenius se transforma a su forma lineal, aplicando logaritmos neperianos a ambos lados de la igualdad:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R} * \frac{1}{T} \quad (8)$$

Ésta ecuación es una línea recta, donde  $Y$  es  $\ln k$ ,  $X$  es  $1/T$ , la ordenada en el origen es  $\ln A$  y la pendiente es  $-E_a/R$ . A través de una tabla de valores de  $k$  frente a  $T$  se obtendrá el valor de  $E_a$ .

### 2.3. Definición de términos básicos

#### Inocuidad

La inocuidad es uno de los cuatro grupos básicos de características que, junto con las nutricionales, las organolépticas y las comerciales, componen la calidad total de los alimentos. Un alimento inocuo es aquel que no ocasiona un daño o enfermedad a la persona que lo consume. Debido a la fuerte relación que existe entre la inocuidad y la salud de los consumidores, el obtenerla adquiere importancia fundamental e indiscutible. Los alimentos durante su obtención, preparación, manipulación, transporte, almacenamiento o consumo, y por causas provocadas no deliberadamente, sufren variaciones en sus

características organolépticas o sensoriales (color, aroma, textura, sabor), composición química o valor nutritivo, de tal manera que su aceptabilidad para el consumo queda suprimida o sensiblemente disminuida, aunque puede sin embargo permanecer inocuo.

#### Bioconservación

La bioconservación puede ser definida como la extensión de la vida de anaquel y seguridad de un alimento a través del uso de microbiota natural o controlada y/o sus compuestos antimicrobianos (Stiles, 1996).

En la bioconservación de alimentos se incluyen desde técnicas utilizadas para obtener alimentos más seguros hasta la generación de alimentos mínimamente procesados y sin aditivos. Por lo anterior, la bioconservación ha tomado un gran auge basándose en el efecto de los llamados bioconservadores que aumentan la vida útil e incrementan la seguridad de los alimentos

#### Bioconservación de productos cárnicos

Los productos cárnicos dependiendo de sus condiciones de almacenamiento representan un excelente medio para el crecimiento microbiano, aún en refrigeración llegan a crecer bacterias gram-negativas aerobias como *Pseudomonas*, BAL anaerobias como *Carnobacterium*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, incluso bacterias tolerantes al CO<sub>2</sub>, como los lactobacilos principalmente *Lactobacillus sakei* y *L. curvatus*, *Leuconostoc carnosum*, *L. gasicomitatum*, *L. mesenteroides*, *Weissella* spp. y *Carnobacterium* spp. Estos microorganismos representan la causa principal de deterioro en productos cárnicos provocando acidez, decoloración, producción de gas, formación de baba y cambios de pH (Chenoll y col., 2007). Adicionalmente, *Brochothrix thermosphacta* es un microorganismo cuyo crecimiento se favorece selectivamente en las temperaturas de refrigeración, razón por la cual es frecuentemente señalado como responsable de la descomposición de alimentos. A pesar de que no se ha comprobado su patogenicidad, se encuentra estrechamente relacionado con géneros como *Lactobacillus* y *Listeria* predominantemente en la descomposición de carnes crudas refrigeradas y

productos cárnicos procesados y almacenados en condiciones de atmósferas modificadas (Masana y Baranyi, 2000). Al desarrollarse esta bacteria en cárnicos, produce olores característicos de los productos fermentados (Gram y col., 2002). Es importante comentar que bajo ciertas condiciones pueden desarrollarse patógenos como E.coli enterohemorrágica y L. monocytogenes. Esta última, tiene capacidad de crecer en refrigeración bajo ciertas condiciones de anaerobiosis y está implicada en brotes por alimentos contaminados (Ryser y Marth, 1999).

#### Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las bacterias ácido lácticas (BAL), se definen como una clase funcional que designa un grupo heterogéneo de bacterias Gram positivas, no patógenas, no toxigénicas, fermentadoras, caracterizadas por producir ácido láctico a partir de carbohidratos, lo que las hace útiles como cultivos iniciadores para la fermentación de alimentos. Comparten otros rasgos comunes como ser aerotolerantes, no forman esporas, no reducen el nitrato y no producen pigmentos (Crittenden, 2009).

El grupo se subdivide en bacterias homo y heterofermentativas en función de los productos de su metabolismo. Las homofermentativas se caracterizan porque el único producto de la fermentación de los carbohidratos es el ácido láctico, mientras que las segundas pueden originar, además, dióxido de carbono, etanol o ácido acético (Kandler, 1994). Dentro de las BAL, los géneros más utilizados para la obtención de alimentos y bebidas fermentadas son *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y dentro del género *Streptococcus* la especie *S. thermophilus* (Ferreira, 2012).

Debido a que las BAL prevalecen en los alimentos fermentados, a su bajo nivel de infección y que son parte de la microbiota normal de las mucosas, se les atribuye su bajo potencial patogénico, por lo que se consideran como organismos GRAS (*General Regarded As Safe*) (Obed, 2011). Las investigaciones realizadas a las BAL demuestran una serie de beneficios potenciales a la salud,

pero los efectos descritos solo pueden ser atribuidos a las cepas analizadas en cada estudio, y no se pueden generalizar a todas las especies, ni a todo el grupo u otras cepas probióticas (Gaggìa, 2010).

#### El suero lácteo

Es un subproducto de la elaboración del queso que se caracteriza por el color amarillo-verdoso y la forma opalescente, y el alto valor nutritivo debido a la presencia de proteínas de alto valor biológico (entre la que se destacan la  $\alpha$ -lactoglobulina y la  $\beta$ -lactoglobulina); las vitaminas del complejo B, y minerales como el calcio y el fósforo. El suero lácteo, además, contiene lactosa en grandes proporciones como carbohidrato estructural, lo que permite el crecimiento y multiplicación de las bacterias acidolácticas. (Miranda, 2009).

El suero lácteo representa, entre otras cosas, una mezcla importante de proteínas que poseen un amplio rango de propiedades químicas, físicas y funcionales, y que, entre otros beneficios para la salud del ser humano, puede estimular la respuesta inmune, modular la motilidad gastrointestinal, prevenir la aparición de diarreas, y proteger contra la infección por el vibrión del cólera y la ocurrencia del cáncer de colon. El suero lácteo también influye sobre la actividad antitrombótica, y estimula la proliferación y las funciones biológicas de las bifidobacterias que predominan en el tracto intestinal de los niños alimentados con leche materna. (Socorro, 2005).

#### El ácido láctico

El ácido láctico es de amplio uso en la industria; debido a sus características benéficas, se utiliza en la industria alimentaria (en bebidas y como conservante), en farmacia, medicina, textilera, en la industria del cuero y para la producción de plásticos biodegradables (Lederberg, 1992). El Food Chemical Codex en el año 1996 especifica el uso del ácido láctico en alimentos con una pureza del 88%.

Los factores limitantes en la producción de ácido láctico por la vía fermentativa son principalmente, la baja concentración de bacterias lácticas en el sistema y la

inhibición del crecimiento por el producto (Monteagudo y Aldavero, 1999; Kulozik, 1998).

Las bacterias lácticas están conformadas por un amplio grupo de bacterias no esporuladas, Gram positivas y que metabolizan un amplio rango de azúcares para producir principalmente ácido láctico (Holt et al., 1998; Herrero et al., 1996). Debido al gran número de bacterias lácticas sólo son de interés los géneros altamente productores de ácido láctico. Para la producción industrial de ácido láctico son de mayor importancia las bacterias lácticas homofermentativas, aquellas que sólo producen ácido láctico (González et al., 2000; Foo et al., 1993). Los mayores productores de ácido láctico pertenecen a las familias *Streptococcaceae* (géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerobacter* y *Gemella*) y *Lactobacillaceae* (género *Lactobacillus*). (Ben Amor et al., 2007; Foo et al., 1993).

#### Metabolismo de hexosas

La fermentación de hexosas se realiza por tres vías metabólicas principales (Fig 1) (Kandler, 1983). Los lactobacilos homofermentativos como son estreptococos y pediococos utilizan la vía de glucosa EMP, y se caracterizan por degradar fructosa 1,6 difosfato aldosa en dos triosasfosfatos, los cuales son convertidos en lactato (Kandler, 1983; Hiyama et al., 1968). Teóricamente esta vía origina a partir de un mol de glucosa, dos moles de lactato. Sin embargo, el rendimiento real a condiciones de laboratorio e incluso de operación es de aproximadamente el 90% del rendimiento teórico (Bruno\_Bárcena et al., 1999; Akeberg et al., 1998). Algunas especies del género *Lactobacillus* son heterofermentativos facultativos; en condiciones de anaerobiosis y microaerobiosis se comportan como homofermentativos, y en condiciones aeróbicas forman además de ácido láctico, ácido acético, acetoina y peróxido de hidrógeno (Li et al., 2006; Porro et al., 1999).

Las bacterias heterofermentativas obligadas como por ejemplo el género *Leuconostoc*, oxidan la glucosa 6-fosfato a 6 fosfogluconato. El producto

final de su metabolismo es una mezcla equimolar de lactato, CO<sub>2</sub> y etanol ó acetato (Kandler, 1983).

### Bacteriocinas

La industria alimentaria ha desarrollado la aplicación de bacteriocinas, producto del metabolismo secundario de algunas bacterias ácido lácticas (BAL) en la conservación de los alimentos. Las bacteriocinas se definen como péptidos de origen proteínico, que a bajas concentraciones presentan inhibición microbiológica efectiva (Beshkova y Frengova, 2012).

Las bacteriocinas son péptidos con actividad antimicrobiana, sintetizados ribosómicamente por las bacterias productoras, generalmente, estos péptidos actúan sobre la membrana celular. Existe una gran diversidad de bacteriocinas reportadas en la mayoría de las especies bacterianas, e incluso dentro de una misma especie podrían producirse distintos tipos de bacteriocinas. (Mondragón Preciado, Escalante Minakata, Osuna Castro, & Ibarra, 2013)

La forma de acción de la nisina es uniéndose a la pared celular mediante atracciones electrostáticas, lo cual se facilita debido a la carga positiva de este péptido y las cargas negativas de los componentes de la pared celular. Posteriormente, la nisina se une al lípido II, el transportador principal de las subunidades de peptidoglicano desde el citoplasma a la pared celular, y por lo tanto previene la síntesis correcta de la pared celular, provocando la formación de un poro transmembranal permitiendo la salida de aminoácidos y ATP, lo que conduce a la muerte celular (Cotter *et al.*, 2005; Hassan *et al.*, 2012).

Según Cintas (1995) las bacteriocinas generalmente se caracterizan por ser estables a valores de pH ácidos o próximos al a neutralidad, lo que indica la adaptación de estas sustancias a las condiciones ambientales de los sustratos en los que se desarrollan las bacterias productoras. La termo estabilidad de las bacteriocinas, al igual que sucede con otras proteínas, está íntimamente relacionada con el pH así, pues, se han descrito numerosas bacteriocinas que

son más termoresistentes a pH ácidos. (Casaus, 2005). Las bacteriocinas están conformadas por puentes disulfuro, tioéter o grupos tiol libres y poseen puntos isoeléctricos en un intervalo de pH 8,6 a 10,4. (Beristan Bauza & López Malo, 2012)

#### Bacterias Aerobias Mesófilas (BAM)

Este grupo está integrado por aquellas bacterias, mohos y levaduras que pueden desarrollarse a 30° C según condiciones establecidas. A la hora de interpretar el RAM se debe tener en cuenta que sólo refleja la presencia de células vivas. Y por otro lado, se debe considerar que, los procedimientos de elaboración de un alimento (como el proceso térmico), pueden llegar a encubrir productos con altos recuentos o con condiciones deficientes de higiene. También se debe atender que, el almacenamiento prolongado en estado de congelación o el descenso del pH durante el almacenamiento, produce la disminución del recuento. El recuento de mesófilos es de gran importancia porque nos indica el estado de sanidad de un alimento.

Su cuantificación estima la cantidad total de flora presente en el alimento sin determinar tipo de microorganismo. Es utilizado para precisar la implementación de buenas prácticas de manufactura, definiendo la calidad sanitaria del mismo. Su número permite evidenciar el contenido microbiano presente en materiales crudos e ingredientes, el grado de eficiencia del procedimiento de elaboración y del proceso, las condiciones de higiene tanto de los equipos como de los utensilios y la relación del tiempo y de la temperatura del alimento durante su almacenamiento y distribución.

La Numeración de BAM puede ser elevado en alimentos perecederos que fueron almacenados por largos periodos de tiempo aunque hayan sido manipulados correctamente. Esto da cuenta que no sólo se ve influenciado por la aplicación de buenas prácticas de manufactura sino por la pérdida de calidad a lo largo del tiempo condicionada por la vida útil del alimento. A su vez, se debe tener en

cuenta que un recuento bajo no implica la ausencia de patógenos ni de sus toxinas.

#### Vida útil

El Institute of Food Technologists define la vida útil de un producto como: “El período entre la manufactura y venta al menudeo de un producto alimenticio, durante el cual el producto es de una calidad satisfactoria”.

Los conceptos “vida de anaquel”, “vida en estante” y, en menor grado, “vida o tiempo de almacenaje”, se utilizan regularmente como sinónimos de vida útil. En ese contexto, la calidad de los alimentos puede ser definida principalmente en términos nutricionales, fisicoquímicos, microbiológicos, de seguridad y sensoriales. Todos estos parámetros son de suma importancia y deben ser evaluados. Sin embargo, el que en todos los casos y con cualquier alimento es medido en forma inmediata por los consumidores, es el sensorial.

El enfoque principal de la definición de vida útil es calidad aceptable para el consumidor. En muchas ocasiones esto se refiere al cuidado de la identidad sensorial del producto, percibida por los consumidores; ésta puede ser equivalente al período durante el cual el producto presenta las características sensoriales óptimas.

El límite de pérdida de calidad que el promedio de los consumidores acepta, es diferente para cada alimento por lo que debe ser cuantificado en forma particular. Los alimentos (materias primas, productos semiterminados y terminados) son susceptibles a diversos cambios durante el tiempo de almacenamiento, muchos de estos cambios son percibidos como deterioro o pérdida de la calidad de los mismos, mientras que otros se clasifican como procesos normales de maduración. Esto es así porque los alimentos son sistemas activos, diversos y complejos en donde se dan reacciones microbiológicas, enzimáticas y fisicoquímicas que afectan su conservación. Un uso práctico de la información de vida útil es establecer la fecha de caducidad, que es colocada en la etiqueta

del producto, con el fin de ayudar a los consumidores en el proceso global de la decisión de compra.

Man y Jones (2000), indican que se usan varias técnicas aceleradas. Cuando estos se usan es por regla general que se induce a una degradación más rápida, y así su normal condición de almacenamiento hace probable que sea menos fiable la estimación de la vida útil. Se han descrito los problemas potenciales y los posibles errores que pueden obtenerse ante el uso de técnicas aceleradas en algunos casos. No hay una ventaja en desestabilizar un producto que es absolutamente estable durante su almacenamiento normal. Los resultados obtenidos de las técnicas aceleradas deben interpretarse con mucha cautela cuando no son aplicables a todos los productos.

### **CAPÍTULO III: HIPÓTESIS Y VARIABLES**

#### **3.1. Hipótesis**

##### **3.1.1. Hipótesis general**

Los productos orgánicos generados por las bacterias ácido lácticas modifican la bioconservación de las hamburguesas de carne de tipo artesanal, valorados mediante modelos matemáticos.

##### **3.1.2. Hipótesis específica**

- Las concentraciones de bacterias ácido lácticas homofermentativas influye sobre la cinética del crecimiento de bacterias alterantes para la conservación de las hamburguesas elaboradas artesanalmente.
- Los extractos crudos de cultivos de bacterias ácido lácticas homofermentativas en suero de leche modifican la cinética del crecimiento de bacterias alterantes y los periodos de tiempo para la conservación de las hamburguesas elaboradas artesanalmente.

- La Nisina modifica la cinética del crecimiento de bacterias alterantes y el periodo de conservación de las hamburguesas elaboradas artesanalmente.
- La vida útil de hamburguesas, elaboradas artesanalmente, se modifica por los productos orgánicos provenientes de bacterias ácido lácticas homofermentativas.

### 3.2. Definición conceptual de variables

- Variable dependiente

Bioconservación: es la extensión de la vida útil de los alimentos empleando la microbiota natural o sus metabolitos.

- Variable independiente

Concentración de Bacterias ácido lácticas homofermentativas y sus productos con actividad biológica: Suero lácteo y nisina

### 3.3. Operacionalización de variables

Variable	Dimensiones	Indicadores	Índice	Técnica estadística	Método y Técnica
<b>Dependiente</b> Bioconservación hamburguesas artesanales	Conservación	Número de días	Tiempo de vida útil	Estadística descriptiva e inferencial	Modelamiento Ecuación de Arrhenius
<b>Independiente</b> Aditivos orgánicos de bacterias ácido lácticas: ✓ UFC/gr ✓ ppm Nisina ✓ % Ácido Láctico	Cinética de crecimiento bacteriano	Parámetros cinéticos de crecimiento	Promedios Variación: $\mu_{max}$ (UFC/g/h) fase lag $\lambda$ (horas)	Estadística Inferencial: Análisis de varianza	Recuento Bacterias mesófilas aerobias Log UFC/g  Modelamiento Baranyi & Roberts

## **CAPÍTULO IV: DISEÑO METODOLÓGICO**

### 4.1. Tipo y diseño de la investigación

#### 4.1.1. Tipo de investigación

La investigación realizado es de tipo prospectivo ya que el registro de información obtuvo según ocurra el experimento, es longitudinal por que las variables se caracterizaron en función del tiempo y así mismo, es experimental por que se manipula la concentración de la población de bacterias ácido lácticas y sus productos con actividad biológica en las hamburguesas artesanales para determinar el tiempo de vida útil.

#### 4.1.2. Diseño de investigación

Se implementarán 3 grupos experimentales de hamburguesas de carne elaboradas artesanalmente que recibirán tratamientos, por separado, con bacterias ácido lácticas homofermentativas (BALH), extracto crudo de cultivo de BAL en suero de leche (ECSL) y Nisina (N). A cada tratamiento se medirán las variaciones de Velocidad de crecimiento ( $\mu_{max}$ ), Tiempo de latencia ( $\lambda$ ) y Tiempo generacional (Tg) con el modelo primario Barangy y Roberts. Estos parámetros cinéticos del crecimiento permitirán determinar el promedio de la velocidad de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) para luego determinar el tiempo de vida útil mediante el modelo secundario de Arrhenius.

### 4.2 Método de investigación

Se utilizó el método de investigación empírica por utilizar una serie de procedimientos experimentales prácticos con el objeto de revelar el comportamiento de microorganismos aerobios mesófilos cuando son tratados con BAL o sus productos metabólicos en las hamburguesas de carne cuyas

características fundamentales y sus relaciones esenciales se puedan modificar y que pueda ser accesibles a la observación sensorial.

Parte de la investigación utilizó el método de la modelación que opera en forma práctica o teórica con un objeto, no en forma directa, sino utilizando cierto sistema intermedio, auxiliar, natural o artificial. En éste método se crean abstracciones con el objetivo de explicar la realidad. Los modelos utilizados analizaron el número, cantidad o extensión del crecimiento de los microorganismos mesófilos aerobios en las hamburguesas de carne, que permitirá la comprensión del funcionamiento de los aditivos orgánicos y que se resolverá a través de los números, es decir las matemáticas obteniendo parámetros cinéticos del crecimiento: Velocidad de crecimiento ( $\mu_{max}$ ), Tiempo de latencia ( $\lambda$ ) y Tiempo generacional ( $T_g$ ) utilizando el modelo Barangy y Roberts.

Para la estimación del tiempo de vida útil se elaboraron curvas de crecimiento a temperaturas de abuso de 15, 25 y 35 °C que permitieron determinar la velocidad de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) y de ésta forma se obtuvo la energía de activación ( $E_a$ ) para determinar el tiempo de vida útil según el modelo secundario de Arrhenius.

#### 4.3 Población y muestra

##### Población

La población está representada por 9 kilos de carne (res y cerdo) que sirvan de sustrato para los fines experimentales del presente estudio.

##### Muestra

Para efectos de la investigación la muestra a obtenerse será del mismo tamaño de la población en donde todo el peso (Kg) de las carnes tendrá la posibilidad de ser ensayada manteniendo poblaciones microbianas convenientemente distribuidas que permiten hacer generalizaciones a partir de los resultados de la muestra con respecto a la población microbiana.

#### 4.4 Lugar del estudio y periodo desarrollado

El estudio se ejecutó en el Laboratorio de Ciencias Naturales de la Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional del Callao, durante el periodo del 01 de mayo de 2019 al 30 de abril de 2020.

#### 4.5. Técnicas e instrumentos para la recolección de la información

##### 4.5.1. Análisis microbiológico de las hamburguesas de carne almacenadas a 4 °C.

Se determinó la calidad microbiológica de las Unidades de hamburguesas de carne que integran los tratamientos experimentales de 100 g cada una, elaboradas artesanalmente y proveniente de una fábrica de la ciudad de Lima.

Se determinó el número de UFC/mL de Aerobios Mesófilos, E. coli, Stph aureus y Salmonella sp siguiendo los métodos de la AOAC-Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official Methods of Analysis of AOAC International. 15<sup>th</sup> edition. Arlington, VA.

Los datos obtenidos se analizaron aplicando la estadística descriptiva con la cual se organizó y describió el conjunto de datos microbiológicos con el propósito de facilitar el uso, apoyándose de tablas, medidas numéricas o gráficas. Además, se calcularon parámetros estadísticos como las medidas de centralización y de dispersión que describen el conjunto por estudiar.

##### 4.5.2. Acondicionamiento del homogenizado de carne para hamburguesas obtenido industrialmente.

Se obtuvo 3 kilos de homogenizado de carne para hamburguesas de una fábrica dedicada a la elaboración de productos cárnicos, con su formulación industrial propia, sin el agregado de aditivo alguno destinado a la conservación del producto.

El homogenizado cárnico fue recolectado directamente del cutter en 3 envases de vidrio estériles con capacidad suficiente para un Kilo.

El suero lácteo fermentado con bacterias ácido lácticas iniciadoras de Kefir (*Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus bulgaricus*) contenía ácido láctico 25.12 g/L. De éste suero se utilizó 100 mL para el tratamiento SL 2.5 % y 50 mL para el tratamiento SL 1.25 %.

4.5.3. Determinación de los parámetros cinéticos del crecimiento del grupo de aerobios mesófilos en hamburguesas de carne con aditivos orgánicos de BALH, utilizando el modelo primario Barangy y Roberts.

Se establecieron 3 grupos experimentales con las siguientes características:

Grupo experimental: Bacterias ácido lácticas homofermentativas activas (BALF), formado por 2 envases estériles, cada uno con 1.0 Kg de homogenizado de carne para hamburguesas. A uno de ellos se le adicionó una concentración celular de  $10^3$  UFC/g y a los restantes,  $10^6$  UFC/g.

Grupo experimental Suero Lácteo (SL): Formado por 2 envases estériles, cada uno con 1.0 Kg de homogenizado de carne para hamburguesas. A uno de ellos se le adicionó suero lácteo desproteinizado a 95 °C con 1.25 % de ácido láctico y al frasco restante suero lácteo con 2.5 % de ácido láctico.

Grupo experimental Nisina: Formado por 2 envases de vidrio estériles, cada uno con 1.0 Kg de homogenizado de carne para hamburguesas. A uno de ellos se adicionó 400 ppm de nisina y al resto 800 ppm.

Una vez homogenizado los aditivos orgánicos en la masa para hamburguesas se procedieron a tomar porciones de 100 g para luego moldearlos, en condiciones de esterilidad, para tener en cada frasco 10 hamburguesas.

Las hamburguesas de cada Grupo experimental son colocadas en contenedores de plástico de 20 Litros de capacidad, debidamente desinfectado con cloro 200 ppm, y almacenado en la cámara congeladora a una temperatura de 4 °C.

#### 4.5.4. Obtención de las curvas de crecimiento.

Inmediatamente después de haberse colocado los contenedores en la congeladora se procedió a tomar, de cada una de ellas, muestras de 10 g y considerar a ésta muestra como muestra inicial ( $T_0$ ); se continuaron tomando muestras cada 24 horas hasta cumplir un número de iteraciones que indiquen haber alcanzado el término de crecimiento logarítmico o hasta que las condiciones del crecimiento bacteriano lo requiera. Cada muestra fue analizada para determinar las UFC/g de los aerobios mesófilos realizando 3 diluciones seriadas 1/10 y de cada una de éstas diluciones se tomaron 1 mL y en forma separada, se depositaron en una placa estéril agregándole de inmediato 12 -15 mL de agar Plate Count (Merck). Se incubaron en aerobiosis a temperatura de 30 °C por un periodo de 24 a 72 horas continuando con su respectiva numeración de colonias y cuantificación expresando el resultado en UFC/mL.

Los valores del crecimiento expresados en UFC/g se convirtieron a Log UFC/mL (Y) y se relacionaron con el tiempo de almacenamiento (X) y de ésta forma se elaboraron las curvas de crecimiento a fin de lograr el ajuste de los datos con el modelo matemático de Barangy & Roberts contenido en el Programa DMfit COMBASE v.2019.

El ajuste de los datos experimentales permitió obtener los parámetros de crecimiento: fase de adaptación o fase Lag ( $\lambda$ ), la tasa máxima de crecimiento exponencial ( $\mu_m$ ) y el tiempo de generación ( $T_g$ ), como descriptores microbiológicos y de ésta manera se pudo utilizarlos para la predicción de la población existente, en un tiempo determinado, en la hamburguesa.

#### 4.5.5. Determinación del tiempo de vida útil de la hamburguesa de carne en función a los microorganismos aerobios mesófilos utilizando el modelo de Arrhenius

Se implementaron tres ensayos de crecimiento de los microorganismos aerobios mesófilos presentes en las hamburguesas de carne a temperaturas de abuso de 15, 25 y 35 °C con la finalidad de obtener la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) para cada temperatura. Se graficaron el  $\ln\mu$  de cada temperatura y se relacionó con la inversa de cada temperatura absoluta ( $1/T$ ), teniendo como resultado el valor de la pendiente de la recta ( $m$ ), la cual es igual a:  $-E_a/R$ ; por lo tanto:  $E_a = -m \cdot R$ ; que en todos los casos será positiva); y el intercepto en el eje "y"; cuando  $X=0$  representa al factor pre-exponencial en logaritmo ( $\ln A$ ). Una vez obtenidos los parámetros se procederá a calcular la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) a 4°C (277°K) reemplazando las constantes en la ecuación de Arrhenius.

#### 4.6. Análisis y procesamiento de datos.

- Calidad microbiológica de las hamburguesas de carne y almacenado a 4 °C. Las características físico químicas y microbiológico de la hamburguesas de carne elaboradas industrialmente se analizaron mediante la aplicación de la estadística descriptiva que mediante el promedio y desviación estándar se pueda explicar la dispersión relativa de las Unidades Formadoras de Colonia (UFC/mL) de los microorganismos aerobios mesófilos, presentes en cada muestra de hamburguesa.
- Crecimiento de microorganismos aerobios mesófilos en hamburguesas de carne con aditivos orgánicos de origen de BAL y conservado a 4 °C. El Modelo de Barangy & Roberts, contenido en el programa ComBase, ajustó los datos experimentales reportando los parámetros de crecimiento y el estadístico coeficiente de correlación ( $R^2$ ) que indica que estadísticamente los valores experimentales de UFC/mL bacteriano y Tiempo a temperatura constante de 4 °C, tienen elevado nivel de confianza.
- Las velocidades de crecimiento ( $\mu_{max}$ ), que corresponden a las bacterias aerobias mesófilas, fueron comparadas mediante el Análisis de Varianza con un nivel de confianza  $\alpha= 0.05$ . Pone a prueba la hipótesis de que las medias de dos o más poblaciones son iguales. Se evaluó la importancia del factor

temperatura al comparar las medias de la variable velocidad de crecimiento, en los diferentes niveles de temperaturas.

- Determinación del tiempo de vida útil de la hamburguesa de carne en función de los microorganismos aerobios mesófilos utilizando el modelo de Arrhenius. La relación de las velocidades de crecimiento ( $\mu$  Ln UFC/mL) y temperaturas de abuso de 15 °C, 25 °C y 35 °C, expresadas como 1/°K permitieron obtener las energías de activación (Ea) y el factor pre-exponencial (A), que son las constantes del modelo de Arrhenius, serán analizadas por el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) que explicará la relación  $\mu$  (Ln UFC/mL) y 1/°K y establecer estadísticamente el grado de confianza.

## **CAPÍTULO V: RESULTADOS**

### 5.1 Resultados Descriptivos

*Evaluación de los parámetros físicos, químicos y microbiológicos de las hamburguesas en estado fresco.*

Las hamburguesas elaboradas artesanalmente, fueron analizadas microbiológicamente según los criterios contenidos en Resolución Ministerial de Salud MINSA 007-2008, que en su artículo 15, “define la aceptabilidad de un producto o un lote de un alimento basado en la ausencia o presencia, o en la cantidad de microorganismos, por unidad de masa, volumen, superficie o lote”.

La misma norma indica que las hamburguesas están consideradas como alimentos que corresponden al grupo 10.7; por lo tanto los valores límites permisibles en las muestras es la ausencia de bacterias patógenas como Salmonella sp.; mientras que para Staphylococcus aureus es  $10^2$  a  $10^3$  UFC/g. Así mismo, se consideró a los indicadores de higiene: Aerobio mesófilos y Escherichia coli, con límites permisibles entre entre  $10^6$  a  $10^7$  y  $10^2$  y  $10^3$  UFC/g, respectivamente. Estos valores caracterizan al alimento como aptos para consumo humano.

Se establecieron 4 grupos experimentales denominados: Control (C), Bacterias ácido lácticas homo fermentativas (BALHF), lactosuero (LS) y Nisina (NS). A cada uno de ellos se realizaron los respectivos ensayos microbiológicos a fin de determinar sus condiciones de inocuidad.

La tabla N° 1, muestra los resultados de los análisis microbiológicos practicados a las unidades de hamburguesas que corresponde a cada grupo; previo a la aplicación con los productos bioconservantes.

Las muestras de hamburguesas de los Tratamientos: C, BALHF, LS y NS, mostraron presencia de microorganismos mesófilos aerobios (MA) en cantidades de 3.24, 3.62, 3.29, 3.37 Log UFC/g, respectivamente; valores que se encuentran por debajo de sus valores mínimos permisibles (6.00 Log UFC/g); Así mismo, no existe diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos respecto a los MA. Este grupo bacteriano es un indicador del grado de contaminación cruzada y explica que todos los tratamiento experimentales contienen unidades de hamburguesas con poblaciones de MA significativamente igual ( $p > 0.05$ ), representando una baja contaminación cruzada.

Referente al grupo Coliformes fecales (Log NMP/g) se presenta en todas las unidades de hamburguesas de cada grupo experimental en cantidades de 1.55, 1.67, 1.89 y 1.16, Log NMP/g, respectivamente. Los grupos experimentales no muestran diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) por lo que se puede inferir que la contaminación fecal es mínima y de las misma magnitud para todos los grupos. Los valores encontrados se ubican por debajo de su valor límite mínimo permisible, que indican que la contaminación de origen fecal puede provenir de la contaminación cruzada de la carne.

Todas las unidades de hamburguesas de cada grupo experimental mostraron valore para *Staphylococcus aureus* en cantidades probables de  $< 10$  UFC/g y ausencia de *Salmonella* sp. en 25 g de muestra analizada.

Estos resultados permiten establecer que las hamburguesas fueron elaboradas bajo los protocolos de las buenas prácticas de manufactura y que en lo sucesivo servirá para la obtención del tiempo de vida útil.

TABLA 1. CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LAS HAMBURGUESAS DE LOS TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES: CONTROL, BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS, LACTOSUERO Y NISINA; SIN ADICIÓN DE LOS PRODUCTOS PRODUCTOS ORGÁNICOS DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS HOMOFERMENTATIVAS				
Agente microbiano	Grupos experimentales de hamburguesas de carne (n=5)			
	Control	Bacterias ácido lácticas	Lacto suero	Nisina
Aerobios Mesófilos (30°C)	3.24 ± 0.44	3.62 ± 0.22	3.29 ± 0.14	3.37 ± 0.26
Coliformes totales (NMP)	1.55 ± 0.09	1.67 ± 0.11	1.89 ± 0.51	1.16 ± 0.21
Staphylococcus aureus	<10	<10	<10	<10
Salmonella sp.	Ausencia/ 25 g	Ausencia/ 25 g	Ausencia/ 25 g	Ausencia/ 25 g

Fuente: Elaboración propia

### *Evaluación de las propiedades físicas químicas de las hamburguesas en estado fresco*

#### Porcentaje de humedad y pH

En la tabla 2, se muestra los grupos experimentales, sin adición de los productos de bioconservación, a los cuales se midió el % de Humedad, observándose que el porcentaje promedio no varía entre los distintos tratamientos experimentales, por lo que se infiere que estos porcentajes aportarán igual cantidad de agua para los microorganismos mesófilos aerobios. Los valores de humedad encontradas

para los tratamientos son: control 66.94%, BALHF 66.82%, Lactosuero 69.64% y Nisina 66.29 %. Comparativamente los tratamientos contienen unidades de hamburguesas con contenidos semejantes de humedad, no existiendo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las unidades de hamburguesas de cada tratamiento.

Las condiciones de pH fueron medidos a las unidades de hamburguesas que pertenecen a cada grupo experimental siendo los resultados de 6.61 para el tratamiento control, 5.55 para BALHF, 5.62 para LS y 5.67 para NIS; no encontrándose diferencias significativa entre los tratamiento ( $p > 0.05$ ).

TABLA 2. PORCENTAJE DE HUMEDAD Y PH PRESENTE EN LAS HAMBURGUESAS DE CARNE DESTINADAS A CADA TRATAMIENTO SIN ADICIÓN DE LOS PRODUCTOS PRODUCTOS ORGÁNICOS DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS HOMO FERMENTATIVAS		
Tratamientos	% Humedad	pH
Control	66.94 ± 0.81	6.61 ± 0.142
BALHF	66.82 ± 1.02	5.55 ± 0.073
Lactosuero	69.64 ± 1.06	5.62 ± 0.121
Nisina	66.29 ± 1.56	5.67 ± 0.051
p<0.05	0.00127215	0.000202738
Fuente: Elaboración propia		

## 5.2 Resultados inferenciales

Determinación del efecto de la concentración de bacterias ácido lácticas homofermentativas sobre la cinética del crecimiento de bacterias alterantes para la conservación de las hamburguesas.

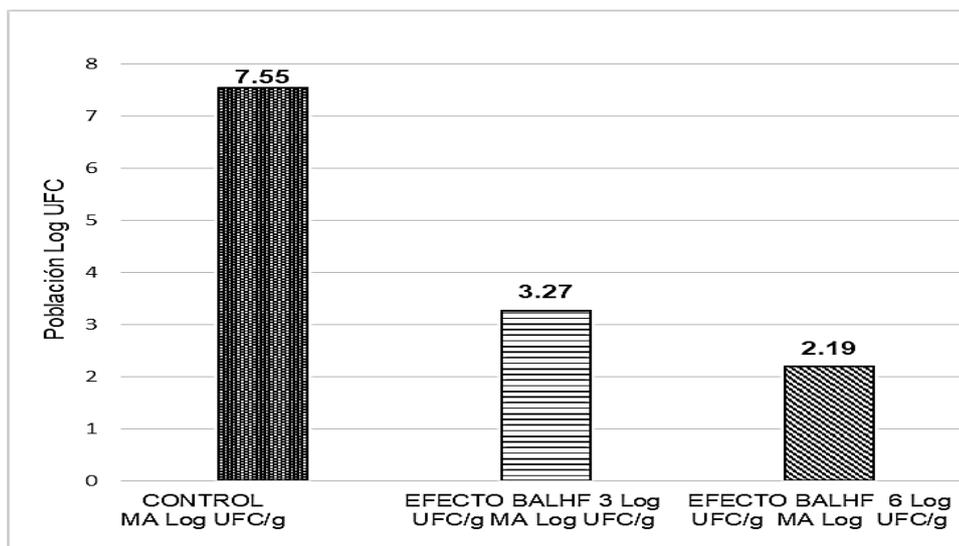
Se realizaron pruebas de antagonismo entre Bacterias ácido lácticas a una concentración de 3 log UFC/g y 6 log UFC/g y bacterias mesófilas aerobias (BMA) en hamburguesas de carne con el fin de evaluar su crecimiento y de esta forma comprobar su capacidad de bioconservación.

Se obtuvieron curvas de crecimiento de BMA por el tiempo de 10 días, con la finalidad de obtener parámetros cinéticos que caractericen el comportamiento de las bacterias mesófilos aerobios cuando tienen como sustrato a las hamburguesas, las cuales le ofrecen todas las condiciones nutricionales para su crecimiento y desarrollo, que finalmente la conduce a su alteración.

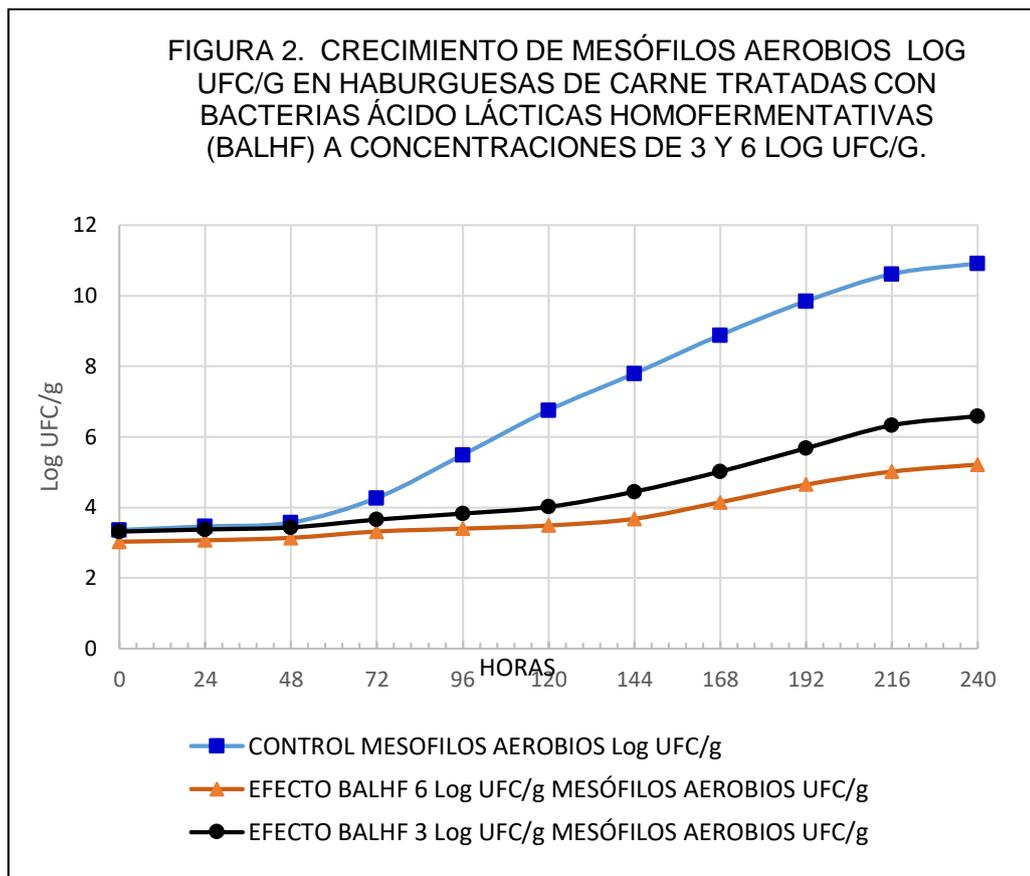
El crecimiento de las bacterias MA en el Tratamiento control (ausencia de BALHF) la población se incrementa en 7.55 niveles logarítmicos; mientras que la presencia de BALHF en las concentraciones de 3 log UFC/g y 6 log UFC/g reducen a niveles de crecimiento a 3.27 y 2.19 Log UFC/g, respectivamente, y por lo tanto que ambas concentraciones de BALHF limitan la el incremento de la población.

La comparación de los niveles de crecimiento hallados demuestran que existe diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ); y que la población 6 log UFC/g es la que mayor impacto tiene sobre el crecimiento de bacterias MA. (Figura 1).

FIGURA 1. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE CÉLULAS ACTIVAS DE BALHF 3 Y 6 Log UFC/g SOBRE LA VARIACIÓN DEL CRECIMIENTO DE BALHF EN HAMBURGUESAS DE CARNE



Fuente: Elaboración propia



Fuente: Elaboración propia

La Tabla 3, muestra el impacto de los las BALHF en concentraciones 3 y 6 Log UFC/g en los valores de Log UFC/g de MA durante el período de conservación de 240 horas, a temperaturas de refrigeración de 4 °C, a través de sus respectivas curvas de crecimiento.

La incorporación de 3 log UFC/g de BALHF en las hamburguesas de carne, afecta el crecimiento a las bacterias MA, presentes en las unidades experimentales, haciendo que tengan un periodo de adaptación o Fase Lag ( $\lambda$ ) de  $98.38 \pm 7.15$  horas, para luego iniciar un crecimiento logarítmico a una velocidad ( $\mu_{max}$ ) de  $0.024 \pm 0.002$  Log UFC/g/h; éste valor indica un crecimiento lento y en consecuencia es probable que la alteración de las hamburguesas de carne está controlado por la presencia de las BALHF. El ajuste de la curva de crecimiento por el modelo de Baranyi & Roberts muestra un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.99. Este valor estadístico es una expresión del elevado

grado de relación existente entre el crecimiento de las BMA y las BALHF.(Tabla 2)

Por otro lado, el crecimiento de BALHF a partir de una población de 6 log UFC/g, incorporada en las hamburguesas de carne, determina que las bacterias BMA tienen un periodo adaptación o Fase Lag ( $\lambda$ ) de  $107.10 \pm 9.28$  horas) y a partir de éste momento se inicia un crecimiento logarítmico a una velocidad ( $\mu$ ) de  $0.017 \pm 0.002$  Log UFC/g/h), cuyo valor indica un crecimiento muy lento y comparativamente menor a la presentada por la concentración 6 log UFC/g. El ajuste de la curva de crecimiento por el modelo de Baranyi & Roberts determina que el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.98. Este valor estadístico es una medida del elevado grado de relación existente entre el crecimiento de las BMA y las BALHF.(Tabla 3, Figura 2)

Comparativamente ambas concentraciones muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) y por su impacto sobre la fase de latencia y velocidad de crecimiento se considera como más efectiva la concentración de 6 log UFC/g de BALHF.

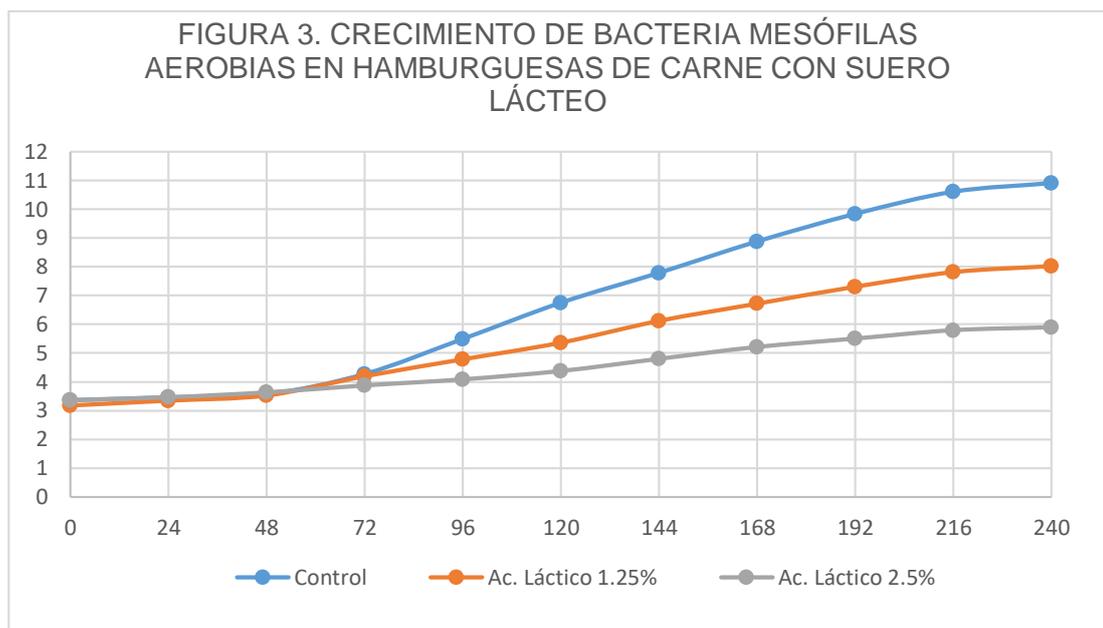
TABLA 3. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE 3 LOG UFC/G Y 6 LOG UFC/G DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BALHF) SOBRE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DEL CRECIMIENTO DE BACTERIAS MESÓFILAS AEROBIAS (MA) EN HAMBURGUESAS DE CARNE CONSERVADAS A 4°C			
Parámetros cinéticos del crecimiento	Control	Mesófilos Aerobios Log UFC/g	
		BALHF 3 Log UFC/g	BALHF 6 Log UFC/g
Población inicial (Log UFC/g)	$3.353 \pm 0.12$	$3.446 \pm 0.07$	$3.157 \pm 0.06$
Fase Lag ( $\lambda$ =horas)	$47.64 \pm 4.77$	$98.38 \pm 7.15$	$107.10 \pm 9.28$
Velocidad crecimiento ( $\mu$ =Log UFC/g/h)	$0.056 \pm 0.003$	$0.024 \pm 0.002$	$0.017 \pm 0.002$
Población final (Log UFC/g)	$9.36 \pm 0.09$	$6.90 \pm 0.43$	$5.35 \pm 0.27$
Coeficiente determinación ( $R^2$ )	0.99	0.99	0.98
D.E. del ajuste	0.16	0.12	0.11

Fuente: Elaboración propia

*Determinación del efecto del ácido láctico del extracto crudo del suero de leche (Lactosuero) proveniente del cultivo de bacterias ácido lácticas homofermentativas, sobre la cinética del crecimiento de bacterias alterantes, para la conservación de las hamburguesas elaboradas artesanalmente.*

Con la finalidad de medir el efecto de Lactosuero sobre el crecimiento de las bacterias BMA, presentes en el producto, se diseñó utilizarlo en dos niveles de concentración de ácido láctico 1.25 % y 2.5% (g/100 mL), los cuales se incorporaron, por separado a la matriz de las hamburguesas. La Figura 3, muestra las curvas de crecimiento de bacterias BMA en presencia de LS con concentraciones de ácido láctico, destacando que las población iniciales son de valores similares, inclusive el Tratamiento control (C), debido a que provienen de una masa cárnica única; sin embargo, las poblaciones finales se modifican después de un periodo de tiempo de 240 horas. Las poblaciones finales de bacterias MA logradas en los tratamientos C, LSB 1.25% y LS 2.5% fueron:  $9.36 \pm 0.09$ ,  $8.16 \pm 0.077$ ,  $5.98 \pm 0.0832$  Log UFC/g, respectivamente. Comparativamente las poblaciones que se generan en cada tratamiento tienen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).

La incorporación de 3 log UFC/g de BALHF en las hamburguesas de carne, afecta el crecimiento a las bacterias MA, presentes en las unidades experimentales, haciendo que tengan un periodo de adaptación o Fase Lag ( $\lambda$ ) de  $26.17 \pm 0.94$  horas, para luego iniciar un crecimiento logarítmico a una velocidad ( $\mu$ ) de  $0.10 \pm 0.003$  Log UFC/g/h; éste valor indica un crecimiento lento y en consecuencia es probable que la alteración de las hamburguesas de carne está controlado por la presencia de las BALHF. El ajuste de la curva de crecimiento por el modelo de Baranyi & Roberts muestra un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.998. Este valor estadístico es una expresión del elevado grado de relación existente entre el crecimiento de las BMA y las BALHF. (Tabla 2)



Fuente: Elaboración propia

Por otro lado, el crecimiento de BALHF a partir de una población de 6 log UFC/g, incorporada en las hamburguesas de carne, determina que las bacterias MA tienen un periodo adaptación o Fase Lag ( $\lambda$ ) de  $36.17 \pm 0.94$  horas) y a partir de éste momento se inicia un crecimiento logarítmico a una velocidad ( $\mu$ ) de  $0.078 \pm 0.003$  Log UFC/g/h), cuyo valor indica un crecimiento muy lento y comparativamente menor a la presentada por la concentración 6 log UFC/g. El ajuste de la curva de crecimiento por el modelo de Baranyi & Roberts determina que el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.997. Este valor estadístico es una medida del elevado grado de relación existente entre el crecimiento de las BMA y las BALHF.(Tabla 3, Figura 3)

Comparativamente ambas concentraciones muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) y por su impacto sobre la fase de latencia y velocidad de crecimiento se considera como más efectiva el lactosuero con la concentración de 2.5 % de ácido láctico.

TABLA 4. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO 1.25% Y 2.5 % DEL SUERO LÁCTEO SOBRE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DEL CRECIMIENTO DE BACTERIAS MESÓFILAS AEROBIAS (BMA) EN HAMBURGUESAS DE CARNE CONSERVADAS A 4°C			
Parámetros cinéticos del crecimiento	Control	Mesófilos Aerobios Log UFC/g	
		Ac. Láctico 1.25%	Ac. Láctico 2.5%
Población inicial (Log UFC/g)	3.35 ± 0.12	3.17 ± 0.045	3.42 ± 0.042
Fase Lag ( $\lambda$ =horas)	47.64 ± 4.77	41.01 ± 3.04	50.26 ± 5.59
Velocidad crecimiento ( $\mu$ =Log UFC/g/h)	0.056 ± 0.003	0.022 ± 0.0006	0.013 ± 0.0006
Población final (Log UFC/g)	9.36 ± 0.09	8.16 ± 0.077	5.98 ± 0.0832
Coefficiente determinación ( $R^2$ )	0.996	0.999	0.996
D.E. del ajuste	0.163	0.056	0.0557

Fuente: Elaboración propia

*Determinación del efecto de la concentración de Nisina sobre la cinética del crecimiento de bacterias alterantes, para la conservación de las hamburguesas elaboradas artesanalmente.*

La Tabla 5, muestra la respuesta del crecimiento de las BMA de las hamburguesas de carne frente a la concentración de Nisina de 400 ppm y 800 ppm, durante el período de conservación de 10 días, a temperaturas de refrigeración de 4 °C, a través de sus respectivas curvas de crecimiento.

La cinética del crecimiento de BMA frente a las concentración de 400 y 800 ppm de Nisina en las hamburguesas de carne, afecta el crecimiento a las bacterias BMA, extendiendo el periodo de adaptación o Fase Lag ( $\lambda$ ) por 53.326 horas, y crecer a una velocidad ( $\mu_{max}$ ) de 0.026 Log UFC/g/h; en tanto que, la concentración de Nisina 800 ppm, el periodo adaptación o Fase Lag ( $\lambda$ ) fue de 76.52 horas) y el crecimiento logarítmico se realizó a una velocidad ( $\mu$ ) de 0.019 Log UFC/g/h),

Éste valor indica un crecimiento lento y es probable que la alteración de las hamburguesas de carne está controlado por la presencia de Nisina. El ajuste de la curva de crecimiento por el modelo de Baranyi & Roberts muestra un

coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.98. Este valor estadístico es una expresión del elevado grado de relación existente entre el crecimiento de las BMA y Nisina 400 ppm.(Tabla 5)

Por otro lado, la concentración de Nisina 800 pp incorporada en las hamburguesas de carne, determina que las bacterias BMA tienen un periodo adaptación o Fase Lag ( $\lambda$ ) de 76.52 horas), para luego continuar con un crecimiento logarítmico a una velocidad ( $\mu$ ) de 0.019 Log UFC/g/h), cuyo valor indica un crecimiento muy lento y comparativamente menor a la presentada por la concentración de nisina 400 ppm. El ajuste de la curva de crecimiento por el modelo de Baranyi & Roberts determina que el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.98. Este valor estadístico es una medida del elevado grado de relación existente entre el crecimiento de las BMA y la concentración de Nisina 800 ppm (Tabla 5)

Comparativamente ambas concentraciones muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) y por su impacto sobre la fase de latencia y velocidad de crecimiento, considerando a la concentración de Nisina 800 ppm como más efectiva

TABLA 5. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO 1.25% Y 2.5 % DEL SUERO LÁCTEO SOBRE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DEL CRECIMIENTO DE BACTERIAS MESÓFILAS AEROBIAS (BMA) EN HAMBURGUESAS DE CARNE CONSERVADAS A 4°C			
Parámetros cinéticos del crecimiento	Control	Mesófilos Aerobios Log UFC/g	
		Nisina 400 ppm	Nisina 800 ppm
Población inicial (Log UFC/g)	3.353 ± 0.121	3.311 ± 0.10	3.355 ± 0.05
Fase Lag ( $\lambda$ =horas)	47.635 ± 4.77	53.326 ± 12.43	76.52 ± 10.61
Velocidad crecimiento ( $\mu$ =Log UFC/g/h)	0.056 ± 0.0032	0.026 ± 0.0015	0.019 ± 0.0012
Población final (Log UFC/g)	9.362 ± 0.09	6.483 ± 0.56	4.891 ± 0.10
Coeficiente determinación ( $R^2$ )	0.996	0.984	0.982
D.E. del ajuste	0.163	0.134	0.0808
Fuente: Elaboración propia			

*Estimación de la vida útil de hamburguesas elaboradas artesanalmente tratadas con productos orgánicos de bacterias ácido lácticas homofermentativas empleando modelos predictivos y pruebas aceleradas de tiempo y temperatura.*

Se determinó la Velocidad de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) de las Bacterias Mesófilas Aerobias presentes en hamburguesas de carne tratadas con Bacterias lácticas homofermentativas (BALHF) conservadas a temperaturas de abuso de 15 °C, 25 °C y 35 °C, las cuales fueron 0.25, 0.32 y 0.51 Log UFC/g/h respectivamente.

El estadístico  $R^2$  o Coeficiente de determinación, da la proporción de variación de la variable velocidad de crecimiento que es explicada por la variable tiempo (variable predictora o explicativa). La proporción está por encima de 0.95 indicando que los cambios en los predictores están relacionados con cambios en la variable de respuesta y que el modelo explica mucho de la variabilidad de la respuesta. (Tabla N° 5)

Del mismo modo se determinó la Velocidad de crecimiento  $\mu_{\max}$  (Log UFC/g/h) de las Bacterias Mesófilas Aerobias en hamburguesas de carne tratadas con Lactosuero 2%, conservadas a temperaturas de abuso 15 °C, 25 °C y 35 °C con velocidades de 0.013, 0.052, 0.121 Log UFC/g/h, respectivamente. El coeficiente  $R^2$  que corresponde a cada temperatura es mayor de 0.95 indicando que los cambios en los predictores están relacionados con cambios en la variable de respuesta y que el modelo explica mucho de la variabilidad de la respuesta. (Tabla N° 6).

De igual forma se determinó la Velocidad de crecimiento  $\mu_{\max}$  (Log UFC/g/h) de las Bacterias Mesófilas Aerobias en hamburguesas de carne tratadas con 800 ppm de Nisina conservadas a temperaturas de abuso con velocidades de 0.196, 0.367, 0.671 Log UFC/g/h, respectivamente. El coeficiente  $R^2$  que corresponde a cada temperatura es mayor de 0.95 indicando que los cambios en los predictores están relacionados con cambios en la variable de respuesta y que el modelo explica mucho de la variabilidad de la velocidad del crecimiento. (tabla N° 6).

.El análisis comparativo de las velocidades de crecimiento de las Bacteria Mesófilas Aerobias ( $\mu_{\max}=\text{Log UFC/g/h}$ ) en la hamburguesas de carne indica que existe diferencias altamente significativas ( $p<0.05$ ) entre los productos orgánicos de las BALHF y de elevada correlación con las variables tiempo y temperatura (Tabla N° 6)..

TABLA N° 6 CONFIABILIDAD ( $R^2$ ) DE LA RELACIÓN VELOCIDAD DE CRECIMIENTO $\mu_{\max}$ (Log UFC/g/h) Y TEMPERATURAS DE ABUSO ( $^{\circ}\text{K}$ ) DE LOS PRODUCTOS ORGÁNICOS				
PRODUCTOS ORGÁNICOS BALHF	Tiempo (días)	Temperatura $^{\circ}\text{K}$	$\mu_{\max}$ (Log UFC/g/h)	Coefficiente de correlación ( $R^2$ )
BAL Log UFC/g	10	288	0.251	0.93
		293	0.322	0.94
		303	0.511	0.95
Suero lacteo 2.5%	10	288	0.013	0.97
		293	0.052	0.96
		303	0.127	0.98
Nisina 800 ppm	10	288	0.196	0.98
		293	0.367	0.98
		303	0.671	0.97
Fuente: Elaboración propia				

#### *Obtención de parámetros de la ecuación de Arrhenius*

Para efectos de obtener el tiempo de vida útil de las Hamburguesas de carne se obtuvieron preliminarmente los parámetros de la ecuación de Arrhenius para establecer la relación de temperatura de abuso ( $^{\circ}\text{K}$ ) y Velocidad del crecimiento ( $\mu_{\max} = \text{Log UFC/g/h}$ ) de las Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA) presentes en las hamburguesas de carne tratadas con una concentración de  $10^6$  UFC/g BALHF. Los valores hallados son  $m = -2016.1$  y  $\text{Ln}A = 7.7349 \text{ LnUFC/g/día}$ . El valor del coeficiente de determinación igual a 0.95 otorga elevada confiabilidad a la relación de las variables .(Tabla 7)

Para el caso de las Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA) en las hamburguesas de carne tratadas con lactosuero 2%, los parámetros de la ecuación de Arrhenius

que relacionan la temperatura de abuso ( $^{\circ}\text{K}$ ) y Velocidad del crecimiento ( $\mu_{\text{max}}=\text{Log UFC/g/h}$ ) fueron  $m= -3838.1$  y  $\text{LnA}=12.48$ . El valor del coeficiente de determinación igual a 0.92 otorga elevada confiabilidad a la relación de las variables. (Tabla 7)

Referente a los parámetros de la ecuación de Arrhenius que establece la relación de temperatura de abuso ( $^{\circ}\text{K}$ ) y Velocidad del crecimiento ( $\mu_{\text{max}}(\text{Log UFC/g/h})$ ) de las Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA) UFC/g en las hamburguesas de carne tratadas con nisina los valores son  $m= -4225.8$  y  $\text{LnA}= 12.593$ . El valor del coeficiente de determinación igual a 0.9513 otorga elevada confiabilidad a la relación de las variables.(Tabla 7)

La determinación de los parámetros del modelo de Arrhenius permitió el cálculo de la energía libre, considerándose como una variable independiente en función de los parámetros  $m$  y  $\text{LnA}$ . Los valores de  $E_a$  hallados para los productos orgánicos de las BALHF: BAL $10^6$  UFC/mL, 16761.98 Ln ufc\*J/g\*d\*mol; Lactosuero 2%, 31911.775 Ln ufc\*J/g\*d\*mol; Nisina 800 ppm, 35135.2958 Ln ufc\*J/g\*d\*mol. El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) denota, para todos los productos de BALHF, están entre 0.93 y 0.95 que refleja la bondad del ajuste del modelo a la variable que pretender explicar. (Tabla 7)

TABLA N° 7. EFECTO DE LAS TEMPERATURAS DE ABUSO: 288, 293 Y 303 $^{\circ}\text{K}$ ,: SOBRE EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS MESÓFILAS AEROBIAS PARA LA OBTENCIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL MODELO DE ARRHENIUS			
Parámetros	PRODUCTOS ORGÁNICOS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS HOMOFERMENTATIVAS		
	BALHF $10^6$ UFC/mL	LACTOSUERO 2.5%	NISINA 800 ppm
$m$ (Ln ufcK/g*d)	-2016.1.	-3838.1	-4225.8
$E_a$ (Ln ufc*J/g*d*mol)	. 16761.98	31911.775	35135.2958
$\text{LnA}$ (Ln ufc/g*d)	7.7349	12.481	12.593
$R$ (J/mol $^{\circ}\text{K}$ )	8.314472	8.314472	8.314472
$R^2$	0.9534	0.9261	0.9513

Fuente: Elaboración propia

El desarrollo matemático del modelo de Arrhenius permitió obtener el tiempo de vida útil de las hamburguesas de carne tratadas con productos orgánicos de Bacterias ácido lácticas homofermentativas, observándose que el mayor tiempo de bioconservación la registra el Lactosuero al 2% que permite una vida útil de 33.74 días, seguida de la Nisina 14.91 días y Log UFC  $10^6$ , 10.20 días; a una temperatura de almacenamiento de 4°C. (Tabla 8)

TABLA N° 8. TIEMPO DE VIDA ÚTIL DE LAS HAMBURGUESAS DE CARNE TRATADAS CON PRODUCTOS ORGÁNICOS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS HOMOFERMENTATIVAS CONSERVADAS A 4°C EN RELACIÓN A SU CONCENTRACIONES ÓPTIMAS.			
Productos orgánicos	Concentración óptima	Tiempo de Vida Útil (días)	Temperatura de Conservación
Bacterias Ácido Lácticas (BALHF)	$10^6$ UFC/mL	10.20	4 °C
Lactosuero	2 %	33.74	4 °C
Nisina	800 ppm	14.91	4 °C

Fuente: Elaboración propia

## CAPÍTULO VI: DISCUSION DE RESULTADOS

### 6.1 Contrastación y demostración de la hipótesis con los resultados

La calidad microbiológica de las hamburguesas de carne depende del tipo de carne utilizada como materia prima, de su proceso de elaboración y sobre todo de la temperatura de procesamiento y de conservación. Algunas de las etapas pueden servir como fuente de contaminación cruzada o favorecer el incremento de su carga microbiana por modificación de su matriz, como es el caso de la etapa del molido de la carne en la cual se incrementa el área enzimática favorable a los microorganismos y al incremento de la contaminación.

Las condiciones expuestas fueron limitadas en las hamburguesas de carne experimentadas porque fueron elaboradas en circunstancias asépticas máximas posibles que determinaron que la carga microbiana presente fue más bajas de la que la normativa nacional NTS N 071-MINSA/DIGESA exige.

El grupo de Mesófilos Aerobios se incluyen todas las bacterias, mohos y levaduras capaces de desarrollarse a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  en las condiciones establecidas. La estimación cuantitativa de éste grupo se considera la microflora total sin especificar tipos de microorganismos, refleja la calidad sanitaria de un alimento, las condiciones de manipulación y las condiciones higiénicas de la materia prima

En éste estudio la determinación cuantitativa de los Aerobios Mesófilos, cultivados a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , no se encontró diferencias entre las unidades experimentales de cada tratamiento. Los valores hallados fueron de 3.24, 3.62, 3.29, 3.37 Log UFC/g, para los tratamientos C, BALHF, LS y NIS, respectivamente; que comparados con los límites tolerantes ( $10^5$ – $10^6$  UFC/g) de la Norma Técnica Peruana (Digesa, 2008), están por debajo de dichos parámetros. Estos valores son similares a los que se hallaron en hamburguesas elaboradas industrialmente (Valero Leal, y otros, 2008) que reportaron valores promedio de  $1.55\text{ log}_{10}$  UFC/g. Estos valores de BMA es considerado como bajo e indicativo de haber sido elaborados con criterios de inocuidad.

El presente estudio acepta la hipótesis que los modelos matemáticos de Baranyi & Roberts y Arrhenius describen el control del crecimiento, de las Bacterias mesófilas aerobias (BMA), por los productos orgánicos elaboradas por las bacterias ácido lácticas homofermentativas e influyen en la bioconservación de las hamburguesas de carne elaboradas en forma artesanal.

## 6.2 Contrastación de los resultados con otros estudios similares.

El criterio general aceptado en las normas de diferentes países es que la carga microbial de BMA en las hamburguesas de carne puede ser de  $10^6$  hasta  $10^7$  UFC/g y se consideran satisfactorio para ser considerados como aptos para consumo humano; tomando en cuenta que la carne es el primer factor del incremento de las poblaciones bacterianas en su matriz que procuran su

deterioro. Así mismo un valor cercano o mayor a  $10^7$  UFC/g coincide con características de alterado y no apto para consumo humano.

En las muestras de hamburguesas, Orellana. ( 2014) reporta que “el recuento de Aerobios Mesófilos Totales (MA) presentes en hamburguesas no superó el límite permitido (UFC/g= $10^6$ ) establecido por el MINS/DIGESA. Se presenta el caso que la presencia de MA pueden estar al borde del límite permisible y por lo tanto no se considera como aptas para el consumo humano, En un estudio comparativo, Morocco., (2019) sobre la calidad microbiológica de hamburguesas de carne, encontró que el 100% de sus muestras tenían una carga promedio de 6.22 Log UFC/g, considerándolas no aptas para el consumo humano”. Contrariamente, Campuzano y col. (2015) “evaluaron la calidad microbiológica de algunos alimentos preparados y servidos en puestos ambulantes y consideraron que las hamburguesas de carne vendidas estaban fuera de los límites permisibles de  $10^7$  UFC/g. Estos casos demuestran la falta de existencia de protocolos de buenas prácticas de manufactura durante el proceso, falta de técnicas de almacenamiento o uso inadecuado de temperaturas.

Las Hamburguesas con un elevado número de AM es un producto con una vida útil corta (García y col.1995); y así mismo, representa un riesgo potencial para la salud del consumidor, por la mayor probabilidad de presencia de patógenos en el mismo, sobre todo cuando las bacterias del grupo coliformes se encuentran a un nivel elevado (Zea y Ríos 2004).

Acerca de la presencia de los Coliformes fecales (expresados como Log NMP/g) en las hamburguesas de carne de los tratamientos C, BALHF, LS y NIS, se encontraron valores situados entre 1.16 y 1.89 log NMP/g considerados como valores significativamente menores ( $p > 0.05$ ) de lo que exige la norma. El contenido de este grupo de bacterias es bajo y un tratamiento térmico posterior, antes de su consumo, se eliminarán fácilmente, por lo tanto su presencia es útil para indicar contaminación postproceso térmico o que éste ha sido deficiente. Así mismo, “la presencia de algunos coliformes (E. coli) en los alimentos puede

deberse a una contaminación específica con heces del hombre y otros animales, pero otros (*Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Erwinia*) generalmente proceden del suelo, agua y vegetales en descomposición. Varios estudios han indicado que los coliformes y *E. coli* están presentes en la carne molida”. (Heredia, 2001; Ionova 1981; Zhao 2002).

Valores similares de Coliformes totales y fecales se encuentran en las investigaciones de Narvaez y col, (2014), “reportan 3.84 log NMP/g en hamburguesas de elaboración industrial. Fahim, et al. (2017), “muestran recuentos mínimo y máximo de coliformes en muestras de hamburguesas de carne congeladas, recolectadas de diferentes localidades (ciudades, centros y aldeas de Benha), sus resultados promedios variaron entre  $0.73 \times 10^2$ ;  $1.29 \times 10^2$  y  $2.23 \times 10^2$  UFC/g, respectivamente”. Mousa, et al. (2014), reporta presencia de coliformes en las hamburguesa de carne con valores promedio de  $2.92 \times 10^2$ , señalando que su presencia comienza en el matadero durante evisceración. Félix-Fuentes y col. (2005), “obtuvieron que el 92% de las muestras de carne para hamburguesas presentan recuentos menores de 1 log NMP/g para coliformes totales”.

Las investigaciones indican que es natural la presencia de Coliformes totales y fecales y probablemente la presencia de *E. coli*, que además son consideradas como organismos indicadores de contaminación fecal reciente. Los organismos indicadores son utilizados para caracterizar la calidad microbiológica de los alimentos y están estrechamente relacionados con la vida útil del producto o su seguridad, señalando la posible presencia de bacterias patógenas que contribuyen a presentación de las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs).

En el presente estudio se aplicó el criterio microbiológico para los patógenos que pudieran estar en la matriz de las hamburguesas, por lo cual se determinó la cuantificación de *Staphylococcus aureus* encontrando que alcanzaban un valor de  $<10$  UFC/g, considerando como un valor por debajo de la exigencia de la

norma (NTS 071 MINSA/DIGESA) de  $10^2$  UFC/g. Encontramos valores parecidos en el trabajo de Zuasnabar y col. (2016), quienes “en las Hamburguesas de carne vacuna libre de gluten, obtuvieron como resultado 100 UFC/g de *Staphylococcus aureus* y que lo consideraron dentro del límite establecido; por lo tanto, fueron declarados aptos para el consumo humano; así mismo”. Fernandez y col. (2006), “realizaron un estudio comparativo de las carnes para hamburguesas y el recuento de *S. aureus* varió entre 0 y 0,44 log UFC/g”.; Félix-Fuente y col. (2005), “determinaron los niveles de carga microbiana de *Staphylococcus aureus* en 30 carnes preparadas para hamburguesas, de las cuales solo el 10% de las muestras presentó un promedio de 3,54 log UFC/g, mientras que el 90% restante presentó recuentos bajos en un rango de 0 a 2,23 log UFC/g. Estos resultados son valores muy cercanos a nuestro estudio e indican que la existencia de éste patógeno puede ser controlado durante y después de la elaboración de las hamburguesas mediante los criterios de inocuidad y seguridad alimentaria”.

La presencia de *Staphylococcus aureus* en las hamburguesas puede deberse a contaminaciones que se producen durante la manipulación por trabajadores portadores sanos a nivel de fosas nasales, faringe y/o piel, también se introducen en la matriz del alimento mediante el uso de utensilios sucios durante su procesamiento; sin embargo, el encontrar un recuento elevado de este patógeno se asocia a prácticas de limpieza y desinfección inadecuadas, así como también a fallas en el control de la temperatura del proceso (Narvaes, 2001).

Para que la presencia de *Staphylococcus aureus* se produzca en las hamburguesas se hace necesario que existan las condiciones de pH cercano a la neutralidad, temperatura alrededor de 30°C y ausencia de microorganismos competitivos. Este último punto es importante, ya que *Staphylococcus aureus* no es competitivo en presencia de otros microorganismos (Camacho, y otros, 2009). Con respecto a las condiciones ambientales, “los alimentos son susceptibles a una contaminación postproceso con tipos enterotoxigénicos de *Staphylococcus aureus*, por ejemplo, si son sometidos a un inadecuado manejo o bien a

temperaturas de conservación inapropiadas; este problema se acentúa por la ausencia de flora competitiva, que normalmente restringe el desarrollo de este microorganismo". (Camacho, y otros, 2009).

Referente a *Salmonella* sps. las muestras de hamburguesas de todos los tratamientos se caracterizaron por mostrar ausencia en 25 g de muestra analizada. Estos resultados se lograron por considerar en la elaboración del producto una buena calidad de carne en condiciones de frescura y poco tiempo de almacenamiento en temperaturas de congelación; proceso que puede influir en la supervivencia de *Salmonella* y por lo tanto una ausencia de ella en los análisis. Las investigaciones realizadas para inferir la presencia de *Salmonella* en hamburguesas es muy variada; sin embargo es poca el reporte de que el nivel de su población es elevada, debido a que las características físico-químico, microbiológicas y sensoriales se pierden y se considera como alimento deteriorado y no apto para el consumo humano. (Narvaez, 2005; Tietjen, 1995).

Su presencia en los alimentos se encuentra en baja concentración, en relación con el resto de la microflora, que habitualmente es variada y abundante o si está presente se encuentra con daños sufridos por la temperatura de congelación durante el almacenamiento lo que dificulta su recuperación y aislamiento (Narvaez, 2005; Tietjen, 1995).

En general, se observa que todos los microorganismos cuantificados en las hamburguesas de carne mostraron una tendencia de estar dentro de las limitaciones de la norma. Mientras que informes científicos los reportan en baja cantidad podría deberse al agotamiento de nutrientes y la acumulación de metabolitos tóxicos, lo cual inhibe la velocidad de crecimiento hasta que la muerte y las divisiones celulares se igualan, permaneciendo así la población constante (ICMFS,1975; Jay, 1978). Otra razón que podría explicar este comportamiento, es que una vez preparada la hamburguesa, recibe microorganismos procedentes de la manipulación, aumentando su carga inicial lo cual crea un mecanismo de competencia o de adaptación entre los diferentes

géneros bacterianos necesarios que sintetizan las enzimas que degradan los sustratos presentes en el alimento (Bourgeois 1994). Se ha señalado que la flora bacteriana presente en las hamburguesas de carne está influenciada por la microflora de la materia prima, las condiciones sanitarias durante el procesamiento, así como también por la temperatura y tiempo de almacenamiento antes de la venta (Foster, 1997).

*Bioconservación de las hamburguesas utilizando productos orgánicos de las Bacterias ácido lácticas homofermentativas.*

La bioconservación de las hamburguesas de carne se estudió preparando tres tratamientos que contenían los productos orgánicos producidas por Bacterias ácido lácticas homofermentativas: Concentración de células de bacterias ácido lácticas homofermentativas (BALHF), lactosuero obtenido por fermentación de las BALHF (LS) y Nisina (NIS).

El impacto sobre el crecimiento de las bacterias MA presentes en las hamburguesas, medido y como resultados se obtuvo que cuando se usó concentraciones de 3 log UFC/g de BALHF, los parámetros de crecimiento se modificaron de tal forma que el periodo de adaptación o Fase Lag ( $\lambda$ ) fue de  $26.17 \pm 0.94$  horas, velocidad de crecimiento logarítmico ( $\mu$ ) de 0.10 Log UFC/g/h; mientras que cuando se utiliza una concentración de 6 log UFC/g el periodo de adaptación o Fase Lag ( $\lambda$ ) fue de 36.17 horas, y la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) de 0.078 Log UFC/g/h). Estos valores expresan que el periodo de adaptación es proporcional al tiempo y la velocidad de crecimiento inversamente. Se interpreta q la alteración de las hamburguesas se prolonga más tiempo cuando se usa BALHF a una concentración de  $10^6$  Log UFC/g ocasionando al final de 10 días una variación máxima poblacional de 2.27 log ufc/g, este valor indica que los MA se desarrollaron en forma lenta en el periodo establecido. Estos resultados nos indican que la incorporación de bacterias ácido lácticas, que poseen un metabolismo homofermentativo, permiten la estabilidad

de la matriz de la hamburguesa favoreciendo su conservación a temperaturas de 4 °C.

Se ha demostrado que el conocimiento del comportamiento de las Bacterias ácido lácticas pueden tener diversas aplicaciones sobre todo las fermentaciones en productos cárnicos y recientemente para frenar el desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes que se presenten en los alimentos (Moreno, 2006; Ghanbari y Jami, 2013)

Se observa que la conservación de la carne y productos cárnicos, como la hamburguesa, puede realizarse empleando bacterias ácido lácticas homofermentativas incorporándolas directamente aprovechando sus propiedades de ser productoras de compuestos orgánicos, como el ácido láctico o bacteriocinas, considerados como compuestos antimicrobianos purificados o semipurificados. (Stiles, 1996; Minor, 1999).

En este estudio la aplicación directa de células activas de BALHF, ha logrado reducir el crecimiento de microorganismos patógenos y de descomposición pero no se logrado inhibir el crecimiento de la carga microbiana nativa indeseable de las propias bacterias lácticas, demostrando en todos los casos un incremento de sus poblaciones, manteniéndose en la fase estacionaria por periodo muy extensos sin lograr niveles mayores de  $10^7$  Log UFC/g; sin embargo “ es probable que alguna de ella, de conducta heterofermentativa, con capacidad de producir ácido acético o productoras de  $H_2S$ , que adicionalmente pueden alterar propiedades funcionales de la matriz de la carne como el pH pudiendo ocasionar la pérdida de textura, capacidad de retención de agua, cohesividad y color” (Minor, 1998).

Consideramos que las carnes son fácilmente alterables, sobre todo si están procesadas, pues tienen un pH entre 5,1 y 5,6, adecuado para el desarrollo de la mayoría de los microorganismos, y un potencial de reducción que permite el crecimiento de los anaerobios en profundidad y los aerobios en la superficie. Investigaciones sobre Bacterias ácido lácticas permiten ver un enfoque diferente

al que se tiene actualmente, cuando se trata de bioconservación debido a que las BAL pueden crecer a temperaturas de 4°C a baja velocidad pero realizando actividades metabólicas.

La técnica de incorporar directamente una población de bacterias ácido lácticas a la matriz de las hamburguesas presenta resultados similares a los encontrados por Minor, et al. (2002) que “utilizó *L. acidophilus* para la elaboración de productos cárnicos tipo salami, con poblaciones de  $10^8$  UFC/ g, conservando la calidad de su producto”. Así mismo Ruiz y col. (2015) “estudiaron la relación del número de *Lactobacillus* en carnes empacadas al vacío según el tiempo. La población inicial fue de  $3.84 \pm 0,15$  Log UFC/g, y pH  $5.55 \pm 0.05$  al término de 21 días la población fue  $6.50$  Log UFC/g  $\pm 0.16$  y pH  $5.58 \pm 0.39$ , la cual se estabiliza por periodos más largos, logrando la conservación de la carne”.

Los estudios de conservación utilizando microorganismos probióticos pueden ser condicionados por los niveles de población utilizado en relación con bajas temperaturas. Así tenemos que “la bioconservación de carne de res (chuleta) con *Lactobacillus acidophilus* sobre *Salmonella spp*, variando la temperatura, concentración del *Lactobacillus acidophilus* y *Salmonella spp*. se demostró que las concentraciones  $10^6$ UFC/g y  $10^7$ UFC/g de *Lactobacillus acidophilus* inhiben el crecimiento de *Salmonella spp*. Para la concentración  $10^6$ UFC/g la temperatura óptima es entre 0 a 4 °C (congelación) y para la concentración  $10^7$ UFC/g es entre 4 a 8 °C, refrigeración”. (Garcia & Sandoval , 2015)

El presente estudió condicionó que la conservación fue a temperatura de 4°C y bajo es perspectiva los resultados hallados concuerdan con los reportados por Garcia y Sandoval (2015) quienes demostraron que las concentraciones  $10^6$ UFC/g y  $10^7$ UFC/g de *Lactobacillus acidophilus* inhiben el crecimiento de *Salmonella* a una temperatura óptima de 4 °C en chuletas de res.

Los resultados hallados por Juven et al. (1992) y Hugas (1998), refieren que “los *Lactobacillus* que crecen en la carne causan interferencia microbiana sobre bacterias patógena a través de distintos mecanismo tales como competencia de

nutrientes y oxígeno, competencia por sitios de adhesión y por la producción de una amplia gama de sustancias inhibitorias, principalmente ácido láctico”. Otros como, Ordoñez et al. (1998), mencionan que “el recuento total de microorganismo mesófilos viables presentes en la carne aumenta continuamente desde el inicio del periodo de conservación, pero después la tasa de crecimiento se estabiliza”; situación que facilitará el predominio metabólico de las BALHF que goce de facultades de Bioconservante cuando es inoculado al momento de la elaboración de las hamburguesas.

Castellano et al., (2011), realizó un trabajo aplicando EDTA (48mM) y los cultivos bioprotectores *Lactococcus lactis* CRL1109 (productor de nisina) y *Lactobacillus curvatus* CRL705 (cargas:  $10^7$ /g) en hamburguesas congeladas de carne vacuna picada, inoculadas con *Escherichia coli* O157:H7 ( $10^2$  cel/g) y sometiénolas a temperatura de abuso ( $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durante 9 días. Los tratamientos simultáneos con cultivos bioprotectores y  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  produjeron una reducción de 1,62, 1,95, 3,41 y 3,90 log a tiempo 2, 3, 6 y 9 días respectivamente en *E. coli* O157:H7, comparados con el control. En coliformes autoctonos, con ese mismo tratamiento, la disminución fue de 1,55 log comparada con el control. Pero sin EDTA no hubo inhibición.

Castellano *et al.* (2008), evaluaron la efectividad de inhibición de cultivos lácticos autóctonos bacteriocinogénicos *Lactobacillus curvatus* CRL705 y *Lactococcus lactis* CRL1109 usados como cultivos bioprotectores, y de sus bacteriocinas (lactocina 705 y nisina), contra *Listeria monocytogenes* ( $10^2$  UFC/g) en hamburguesas almacenadas a  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La adición de  $10^6$  UFC/g de cada cultivo bioprotector en forma individual a la carne produjo un efecto bacteriostático sobre *L. monocytogenes* durante la 72 h de almacenamiento a  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  bajo condiciones aeróbicas. No se observó efecto sinérgico cuando ambos cultivos se aplicaron en forma conjunta. Sin embargo, cuando se aplicaron sus bacteriocinas liofilizadas se observó la inhibición inmediata del microorganismo patógeno, lo cual demuestra su

mayor efectividad en comparación con la aplicación de los cultivos bacterianos que la producen.

Belfiore *et al.*, (2007), ensayando la efectividad en medio de cultivo líquido, la nisina producida por la cepa autóctona *Lactococcus lactis* CRL1109 ha producido la inactivación total de las cepas más sensibles de *E. coli* O157:H7 cuando se aplica en forma combinada con 1000 mM de EDTA (cargas iniciales 5 log) y un descenso de la población de 2 log en las cepas más resistentes

Vignolo *et al.* (2005), evaluaron el efecto de la aplicación de la cepa autóctona *Lactococcus lactis* CRL1109 productora de nisina, en la extensión de vida útil de recortes bovinos y porcinos almacenados a 8 °C. La aplicación de la cepa bacteriocinogénica en forma de spray a en recortes vacunos, la impregnación con el cultivo protector mostró un efecto bacteriostático sobre la microbiota total retardando su deterioro en 10 días mientras que en cortes porcinos se observó una disminución de 2,9 log en la población de coliformes a los 15 días de almacenamiento a 8 °C.

Los resultados del presente estudio permiten inferir que la concentración de 6 Log UFC/g de BLHF cumple con los criterios para preservar las condiciones microbiológicas de la hamburguesas de carne experimentados otorgándoles condiciones de inocuidad.

Actualmente la industria alimentaria, para extender la vida útil de los alimentos, utiliza conservantes químicos como el ácido benzoico, sórbico y propiónico. Por otro lado existe mucho interés por la bioconservación natural que pueden aportar bacterias ácido lácticas (BAL), aumentando su interés como una alternativa para poder utilizarla en lugar de aditivos químicos.

El uso de bacterias del ácido láctico se ha reconocido ampliamente como una fuente natural de conservantes que mejoran la calidad sensorial de los alimentos procesados y promueven la salud de los consumidores. BAL produce una

variedad de compuestos de bajo peso molecular que incluyen ácidos, alcoholes, dióxido de carbono, diacetilo, peróxido de hidrógeno y otros metabolitos. Muchos de estos metabolitos tienen un amplio espectro contra bacterias, hongos y levaduras en especial el ácido láctico que es el principal metabolito producido por las bacterias lácticas, responsable a menudo de la reducción del pH en distintos alimentos.

El presente estudio utilizó el extracto crudo del suero lácteo (SL) con un contenido de ácido láctico del 1,25 y 2.5 %, para obtener respuestas de impacto sobre las bacteria mesófilas aerobias (MA) presentes en las hamburguesas de carne, obteniendo sus parámetros de crecimiento y de esa forma poder describir el efecto de la concentración del ácido láctico.

El efecto del ácido láctico del LS se sintetiza en las respuestas de la MA referente al tiempo (h) de su fase lag ( $\lambda$ ) o adaptación y su velocidad de crecimiento ( $\mu$ ). Respecto al primero el tratamiento con ácido Láctico 2.5 %. es la que mejor impacto logró. La fase de latencia tiene una duración de 50.26 hr, mientras que la SL con 1.25% fue de 41.01 h. Estas respuestas está dependiente de los factores intrínsecos que le puede ofrecer la carne de la hamburguesa, como pH, humedad y disponibilidad de nutrientes energéticos. Estos resultados nos indican que las poblaciones iniciales en ambos tratamientos son parecidas tanto en calidad y cantidad, haciéndose diferentes por su estado fisiológico frente al incremento de ácido láctico.

Se debe considerar que el ácido láctico es un desinfectante de contacto y su agotamiento estará en función de su carga microbiana a la cual afecta; sin embargo, las dos concentraciones afecta el inicio de la fase logarítmica por un tiempo aproximado de 2 y 3 días para 1.25 % y 2.5 % de ácido láctico, respectivamente, quedando en la matriz de la carne suficiente concentración de ácido láctico para seguir actuando durante las siguiente fases del crecimiento. La velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) disminuye sensiblemente cuando se aplica 2.5 % de ácido láctico. El crecimiento logarítmico se realiza a diferentes velocidades

para ambas concentraciones siendo la mayor velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) 0.028 Log UFC/g/h) para 1.25% y para 2.5 %, 0.015 Log UFC/g/h. Estos resultados demuestran que el ácido láctico no permite el crecimiento y desarrollo de la MA presentes naturalmente en la matriz de las hamburguesas de carne, durante el tiempo experimental de 10 días a 4 °C.

Si consideramos la variación de población entre los tratamientos de 1.25 % y 2.5% fue determinante para los intereses de los objetivos del estudio, debido a que la variación de la población fue 4.99 y 2.56 niveles logarítmicos, respectivamente muestra claramente la condición estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ) entre dichos tratamientos; siendo más eficiente su actividad antimicrobiana el tratamiento 2.5 %. Este valor visto desde el enfoque de la NTP no alcanza el límite máximo permisible de 7 Log UFC/g; permitiendo inferir las unidades experimentales del tratamiento 2,5% se conservan en condiciones de inocuidad.

Se ha demostrado que existe actividad biológica de los compuestos orgánicos presentes en los sustratos utilizados por las BAL sobre microorganismos alterantes o patógenos cuando se le utiliza como aditivo conservador. Vanegas y col (2011), demuestran que “existe efecto del extracto crudo de metabolitos procedente de un cultivo de bacterias ácido lácticas y que es capaz de prolongar el periodo de vida útil de la carne de res empacada en atmósfera modificada por aproximadamente 2 días. Disminuyó en dos unidades logarítmicas los recuentos de la microbiota acompañante, de microorganismos causantes de deterioro como *Pseudomonas*, BAL, mesófilos y psicrófilos, además de mantener el pH y las características sensoriales en un rango aceptable”.

Jurado y col. (2017) determinaron el efecto del sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus lactis* en lomo de cerdo. Utilizaron (500  $\mu$ l) del sobrenadante en 50 g de lomo, de testigos usaron ácido láctico (2 %) y suero fisiológico (sin aditivo). Evaluaron cada tratamiento a 4 y 20 °C por 15 días. Obtuvieron mejores resultados a la temperatura de 4 °C. Concluyeron que el sobrenadante de *L. plantarum* conserva mejor el lomo de cerdo; además,

mantiene las características organolépticas y evita el crecimiento microbiano. Mientras que *L. lactis* mostró resultados similares al ácido láctico y por encima del tratamiento sin aditivo.

Abad y Llenque (2014) evaluaron “el efecto bactericida del sobrenadante del cultivo de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* sobre la supervivencia de *Salmonella typhi*. Los resultados evidencian una disminución de las unidades formadoras de colonias (UFC/mL) de *S. typhi* hasta las 24 h de evaluación en condiciones de refrigeración. Por lo que concluye que el sobrenadante de *B. animalis* subsp. *lactis* sí afecta la supervivencia de *S. typhi* en las condiciones de ensayo”

Existe información científica sobre el uso del lactosuero en los alimentos que permiten su incorporación dirigiendo su atención de su actividad antimicrobiana a la presencia del ácido láctico y otros metabolitos que generan las bacterias ácidos lácticas. Sin embargo, es muy diverso los criterios de la investigación y muchas de las variable independientes a estudiar tienen objetivos diversos y la metodologías utilizadas utilizan técnicas diversas y sobre todo dirigido a las bacterias patógenas. Es escasa la información dedicada a los microorganismos nativos o alterantes, quienes afectan la gestión de la inocuidad a nivel de la producción comercialización y el consumo. En este sentido, los microorganismos mesófilos aerobios encierran a microorganismos indicadores e índices que se encuentran en los alimentos.

Los resultados obtenidos en esta investigación, referido a la incorporación de lactosuero crudo a la formulación de las hamburguesas de carne, considerando sus concentraciones de ácido láctico de 1.25 % y 2.5 % lo encontramos en El-Khateib et al. (1993), quienes reportaron “el efecto antimicrobiano del ácido láctico al 2% sobre carne picada, en forma de cubos sumergidos en una suspensión de *L. monocytogenes* por un minuto y almacenadas a 4°C por 48 horas, fue una disminución del número de células del patógeno de 0.6 log UFC/cm<sup>2</sup> para el ácido láctico al 2%, resaltando su efecto bactericida y tener

efecto residual”. Castillo et al. (1998) coincide en que “el ácido láctico al 2% aplicado a las canales mediante pulverización obtuvieron una reducción del número de microorganismos presentes en las superficies de las canales de 4.6 a 4.9 log UFC/cm<sup>2</sup> “.Gómez y col.(2013) “adicionaron a las hamburguesas ácido láctico presentando menor incremento de coliformes y mesófilos del 2° al 10° día de almacenamiento que en promedio fue de 1.83 y 1.38 log<sub>10</sub> UFC/g, respectivamente, en contraste de 3.89 y 3.45 log<sub>10</sub> UFC/g en el testigo”. Las combinaciones de 2% de NaCl con 2% o 3% de lactato causaron la inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes*. (Ning y col. 2016).

Cabe mencionar que las sales de lactato son eficientes para la conservación de los alimentos. Así tenemos que Davidson y Taylor, (2007) utilizaron “mezclas de lactato de sodio o calcio (1,25 a 6%) y diacetato de sodio (0,25 a 5%) demostrando puede controlar el desarrollo microbiológico en carnes. Los compuestos en combinación fueron capaces de reducir los recuentos totales de 1,5 a 2,5 log UFC después de 2 a 3 semanas de almacenamiento”. Del mismo modo, Van der Marel y col. (1988), “realizaron estudios en carcasas de pollo evidenciando que es mayor la reducción del recuento de mesófilos aerobios y psicrotrofos cuando el tratamiento con ácido láctico se realiza luego del desplume. Reducciones de log<sub>10</sub> 5,2 a log<sub>10</sub> 3,7 se evidencian en el recuento de colonias aerobias mesófilas en tratamientos después del desplume con ácido láctico en concentraciones de 1 al 2%. Luego de su almacenamiento los productos tratados con ácido láctico aumentaron su vida útil en refrigeración llegando hasta recuentos de 7-8 log<sub>10</sub> a los 18 a 22 días de su refrigeración”.

Las concentraciones utilizadas en este estudio 1.25 y 2.5% son cercanas a los utilizados por Conner et al. (1997), quienes “utilizaron concentraciones de 2% y al 4% de ácido láctico; para ello inocularon 3 log UFC/g de *L. monocytogenes* en piezas de carne bovina las cuales fueron pulverizadas con ácido láctico al 2% y al 4%. Después de la refrigeración 4°C durante cuatro días, obtuvieron una reducción de 0.3 log UFC/g para el ácido láctico al 2% y de 0.44 log UFC/g para

el ácido láctico al 4% demostrando un mayor efecto bactericida del ácido a mayor concentración.

La experiencia aportada por este estudio permite considerar que la “eficacia antimicrobiana del ácido láctico, la cual está relacionada con el pH,  $A_w$  y temperatura a 4 °C, es debido a la forma no disociada del ácido que es el principal responsable de la inhibición de los microorganismos, debido a que puede penetrar la membrana lipídica de las células con mayor facilidad. A nivel del citoplasma, cuyo pH es más alto que el exterior, se disocia”. (Davidson y Taylor, 2007). “Las bacterias mantienen un pH interno cercano a la neutralidad para evitar desnaturalizaciones de las proteínas estructurales, enzimas, ácidos nucleicos y fosfolípidos. La generación de protones a partir de la disociación intracelular del ácido orgánico, acidifica el citoplasma y deben ser eliminados al exterior. La teoría quimiostática explica que la membrana citoplasmática es impermeable a los protones y deben ser transportados al exterior. Esta extrusión de protones crea un potencial electroquímico a través de la membrana llamada “fuerza protomotiva (PMF)”. “Esta perturbación de la función de la membrana por los ácidos orgánicos da lugar a un mecanismo inhibitorio afectando gravemente a su metabolismo, ya que afecta al gradiente de protones y de carga con el exterior, e interfiere con los sistemas de transporte de aminoácidos y fosfatos. Además, muchas enzimas esenciales para el metabolismo microbiano se inactivan a pH ácidos”. (Davidson y Taylor, 2007).

Otra forma de bioconservación de las hamburguesas de carne fue mediante el uso de la bacteriocina como la Nisina basado en que no son cultivos vivos, por lo que pueden incorporarse a los alimentos sin necesidad de realizar modificaciones significativas en los procesos de su elaboración; además, su manejo y conservación son sencillas de manipularse. Existe un condición para su uso y debe utilizarse en la concentración inhibitoria mínima (CIM) efectiva y ser consideradas como GRAS.

Las nisina es una sustancia ácida y es más estable en y su estabilidad depende de ésta condición. Sus soluciones a un pH 2 son estables cuando es almacenada

a temperaturas entre 2 y 7 °C, además soportan el calentamiento hasta 121 °C sin pérdida de actividad. No tolera condiciones de pH alcalino perdiendo su actividad, destruyéndose a en 30 min. a 63 °C y pH 11. Para ser usadas en los procesos de conservación de alimentos se aplican bajo la forma de soluciones acuosas, no siendo solubles en disolventes polares.

En este estudio se utilizó nisina a las concentraciones de 400 y 800 ppm y se midió, para cada tratamiento, su efecto sobre el crecimiento de las bacterias MA, que fueron descritas por sus parámetros de crecimiento como la fase de latencia ( $\lambda$ ) y la velocidad del crecimiento ( $\mu$ ). Las curvas de crecimiento obtenidas tienen un valor muy alto del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) igual a 0.98, que indica una alta aceptabilidad de los datos experimentales al ser ajustados por el modelo de Baranyi y Robert.

Referente al crecimiento de las bacterias MA en los tratamientos Control, 400 ppm y 800 ppm, el análisis de varianza demostró que las velocidades de crecimiento 0.056, 0.016 y 0.011 UFC/g/h, respectivamente; comparativamente tienen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). y el análisis de Tuckey señala que el tratamiento 800 ppm es el más efectivo para controlar la carga de bacterias MA existente en la matriz de las hamburguesas. Las hamburguesas experimentadas en este estudio tuvieron un pH de 5.67 y al término del periodo experimental de 10 días disminuyó a 5.4.

La efectividad de la nisina está relacionada a los diferentes valores de pH que puede tener el sustrato. En este caso el pH inicial de las hamburguesas es ligeramente ácida pero lo suficiente como para poder activarse la nisina desde un primer momento de tal forma que las UFC/g de las BMA generen una variación poblacional de 3.16 y 1.53 Log UFC/g a velocidades de crecimiento de 0.016 y 0.011 Log UFC/g/h, para los tratamientos 400 ppm y 800 ppm, respectivamente. Se observa que el crecimiento es muy lento producto de la presencia de la nisina y la conservación a temperatura de 4 °C. El tratamiento

control se caracterizó por tener una variación poblacional de 6.11 UFC/g y una velocidad de crecimiento de 0.056 Log UFC/g/h, a temperatura de 4 °C.

Tratando de establecer alguna comparación referente a la concentración utilizada en este estudio de 800 ppm, encontramos el estudio de Sánchez (2019), quien menciona “que los diferentes estudios demuestran que 2,000 ppm de nisina comercial tienen efecto bacteriolítico sobre *L. fructivorans* a pH 6,5, mientras que a pH 3,5 presenta un modo de acción bactericida. Por otro lado, su uso está en función de los microorganismos alterantes nisina-sensibles que están presentes en el alimento y que todos ellos no tienen igual respuesta a la nisina, como es el caso de los géneros *Bacillus* y *Clostridium* que tienen capacidad de formar esporas y son determinantes de la vida útil de los productos alimenticios procesados térmicamente. Es importante reconocer su estabilidad térmica en condiciones de acidez”. Al respecto, la concentración utilizada deviene de estudios preliminares que se realizó utilizando concentraciones menores de 400 ppm los cuales no mostraron efectos sustantivos sobre BMA en las hamburguesas de carne.

Schillinger et al. (2001), Demostraron que, “en medio de cultivo líquido, cultivos bioprotectores bacteriocinogénicos nisina-resistente constituidos por cepas de *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus sakei* ( $10^6$  cel/ml), usados en combinación con nisina (Nisaplin, 100 UI/ml) fueron capaces de suprimir la proliferación de células de *Listeria* (carga original:  $10^6$  cel/ml) que sobrevivieron al tratamiento luego de 7 días de incubación a 10 °C (carga final  $10^2$  cel/ml)”.

Schillinger et al. (2001), utilizó tofú casero como sistema alimenticio modelo para evaluar el efecto inhibitorio contra *Listeria monocytogenes* (carga inicial:  $10^2$  cel/g) de la nisina o su combinación con bacterias lácticas bacteriocinogénicas (carga inicial  $10^6$  cel/g), durante el almacenamiento a 10 °C por una semana. En los ensayos en los que se usó solamente nisina, se requirieron 2000 UI/ml para mantener en el límite de detección la carga de *Listeria*, mientras que en los ensayos con la aplicación combinada de nisina + cultivos lácticos fue suficiente

la adición de 700 UI de nisina/ml, para obtener el mismo resultado. Por lo tanto, se consiguió un mayor efecto inhibitor de *Listeria monocytogenes* con la aplicación de nisina y cultivos bioprotectores.

Otro aspecto relevante que se debe considerar es la carga microbiana inicial en el sustrato, la cual se controla eficientemente cuando su valor es 3 log UFC/g. Este valor se consigue poniendo en práctica los protocolos de limpieza y desinfección masi como también la vigilancia y control de peligros en el momento de su elaboración. Como resultado se obtiene un producto más estable durante el periodo de su vida útil.

Dentro de la población mesofílica aerobia es probable la presencia de bacterias coliformes totales o fecales que de alguna forma se controló con la concentración de 800 ppm; sin embargo, Gharsallaoui (2016) consideró que “el mejor tratamiento para el control de microorganismos fecales a lo largo del período de 12 días, fue el extracto crudo de bacteriocinas, que impidió el desarrollo de colonias fecales en niveles superiores a 1.5 log NMP/g durante la mayor parte del periodo. En el día 3 los valores alcanzados para extracto crudo de bacteriocinas fue de 1.34 Log NMP/g y el control 2.66 log NMP/g, comprobando el efecto bacteriostático del extracto crudo frente a los microorganismos fecales. De forma similar para el día 8 los recuentos fueron 2.73 y 2.93 log NMP/g para ácido láctico y control respectivamente, mientras que el extracto crudo de bacteriocinas sólo permitió el desarrollo de 1.38 log NMP/g.

Peña et al. (2013) “evaluaron el efecto de la aplicación de diferentes bacteriocinas y ácidos orgánicos sobre la vida útil de salchichas envasada al vacío y almacenadas a temperatura de abuso (10 °C) durante 36 días. Nisina y bacteriocinas producidas por las cepas autóctonas *Lactobacillus curvatus* CRL705 y *Lactobacillus sakei* CRL1862, solas o en combinación con ácido láctico y acético (2,5%) se aplicaron por inmersión en salchichas previamente inoculadas con *L. monocytogenes* (10<sup>3</sup> UFC/g). En los tratamientos con bacteriocinas + nisina + ácidos orgánicos se obtuvieron reducciones iniciales de

1,9 log CFU/g de *Listeria*, y ya no se encontraron células viables desde el día 6 hasta el final del periodo de incubación”.

La nisina inhibe los microorganismos alteradores, incluidas las bacterias de deterioro del ácido láctico, ayudando a prolongar el período de validez y mantener la calidad del producto. También se utiliza cada vez más como una intervención primaria para desactivar o inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos en los alimentos, como *Listeria*, *Staphylococcus* y *Mycobacterium*, y las bacterias de formación de esporas *Bacillus* y *Clostridium*, ayudando a aumentar la inocuidad del alimento. La dosis de nisina necesaria para obtener el efecto deseado depende de varios factores, que incluyen el procesado y las condiciones de almacenamiento, las materias primas utilizadas, la carga bacteriana y la formulación del producto a elaborar.

Los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron el efecto de la nisina a la concentración de 800 ppm, sobre el crecimiento de las BALHF presentes en las hamburguesas de carne. Los mecanismos de acción de las nisinas se han explicado que ellas poseen un mecanismo de acción dual como lo detalla Breukink y col., (1999), quien propone que inicialmente la bacteriocina se une a la pared celular mediante atracciones electrostáticas, lo cual se facilita debido a la carga positiva de este péptido y las cargas negativas de los componentes de la pared celular. Posteriormente, la nisina se une al lípido II, principal transportador de las subunidades de peptidoglucano y utiliza esta molécula para anclarse a la membrana celular. Luego, la bacteriocina cambia su orientación con relación a la membrana y se inserta en esta última, lo que involucra la traslocación de su extremo carboxilo terminal a través de la membrana. Finalmente, la unión de diversos péptidos en el sitio de inserción provoca la formación de un poro transmembranal que permite la salida de moléculas importantes como aminoácidos y ATP, lo que lleva a la bacteria a una rápida muerte celular. (Wiedemann y col., 2001).

*Determinación de la vida útil de las hamburguesas con bioconservantes*

La vida útil, según Gyesley, (1991) es el período de tiempo en que la calidad definida de los alimentos y otros productos perecederos permanecen aceptables bajo las condiciones esperadas (o especificadas) de distribución, almacenamiento y exhibición. Así mismo, el deterioro es el proceso por el cual los alimentos se deterioran hasta el punto en que los humanos los consideran no comestibles o su calidad se reduce, lo que los hace indeseables o inadecuados para la venta o el consumo.

Las Curvas de Crecimiento se obtuvieron en condiciones particulares como es el caso del sustrato, que en esta oportunidad es la hamburguesa de carne al cual se le incorporó el bioconservante que dio el mejor impacto sobre las BMA; de ésta manera la velocidad de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) que se obtenga en temperaturas de abuso, es más cercana a la realidad y de ésta manera las predicciones a otras temperaturas que las experimentadas resulten representativas y confiables.

La estimación del tiempo de vida útil se inició aplicando el “test acelerado” al crecimiento de bacterias mesófilas aerobias (BMA) en hamburguesas de carne en condiciones de almacenamiento a temperaturas de 15 °C, 25 °C y 35 °C, con bioconservantes, BALHF 6Log UFC/g, SL 2.5% y NIS 800 ppm, en un periodo de 10 días. Los valores de crecimiento (Log UFC) en función del tiempo (días), se ajustaron con el modelo de Baranyi & Roberts (Zwietering et al.,1990), del cual se derivan los parámetros de crecimiento como la tasa de crecimiento específica ( $\mu_{max}$ ) y el tiempo de adaptación o fase Lag  $\lambda$ .

El análisis de las velocidades de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) de BMA en las hamburguesas de carne con la adición de productos derivados de BALHF a temperaturas de abuso de 15 °C, 25 °C y 35 °C, demostró que los tres bioconservantes tuvieron impacto, en mayor o menor grado, sobre el crecimiento de las BMA, destacando al SL 2.5% de ácido láctico que reduce la velocidad de crecimiento  $\mu_{max}$  al nivel de 0.013, 0.052, 0.127 Log UFC/g/h para las temperaturas de 15 °C, 25 °C y 35

°C respectivamente. Con menor impacto se presenta la Nisina 800 ppm seguido de la concentración 6 Log UFC/g actividad de BALHF.

Estas velocidades fueron utilizadas para obtener previamente los valores de los parámetros de la ecuación de Arrhenius los cuales se calcularon relacionaron las temperaturas de abuso ( $1/^\circ\text{K}$ ) utilizadas y su respectiva Velocidad del crecimiento ( $\mu_{\text{max}}$ ) expresado en Ln UFC/g/h). La relación gráfica se expresa en una ecuación que contiene los valores m y LnA.

Para predecir la vida útil de los alimentos refrigerados en función del crecimiento microbiano, se utilizaron los criterios y conceptos de la "microbiología predictiva" (Buchanan, 1993). Se utilizaron los modelos Baranyi & Roberts y de Arrhenius, el primero permite obtener el parámetro cinético de crecimiento velocidad de crecimiento ( $\mu_{\text{max}}$ ) de las BMA, dentro del rango de temperaturas de interés para las hamburguesas, parámetro necesario para utilizar el modelo de Arrhenius que permitirá establecer el tiempo de vida útil de la hamburguesas de carne.

La ecuación de Arrhenius es una fórmula que permite estimar la dependencia de las tasas de las velocidades del crecimiento de BMA con la temperatura, tiene una aplicación amplia e importante en la determinación de la velocidad del crecimiento y el cálculo de la energía de activación (Laidler, 1987). La velocidad de crecimiento depende de la energía de activación para las reacciones químicas del metabolismo bacteriano y es específica del producto.

La determinación de los parámetros del modelo de Arrhenius permitió el cálculo de la energía libre, considerándose como una variable independiente en función de los parámetros m y LnA. Los valores de  $E_a$  hallados para los productos orgánicos de las BALHF son: 6 Log UFC/mL, 16,761.98 Ln ufc\*J/g\*d\*mol; Lactosuero 2.5%, 31,911.775 Ln ufc\*J/g\*d\*mol; Nisina 800 ppm, 35,135.2958 Ln ufc\*J/g\*d\*mol. El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) denota, para todos los productos de BALHF, están entre 0.93 y 0.95 que refleja la bondad del ajuste del modelo a la variable que se pretender explicar

El desarrollo matemático del modelo de Arrhenius permitió obtener el tiempo de vida útil de las hamburguesas de carne tratadas con productos orgánicos provenientes de Bacterias ácido lácticas homofermentativas, observándose que el mayor tiempo de bioconservación la registra el tratamiento LS 2.5% ácido láctico, el cual permite una vida útil de 33.74 días, seguida de la Nisina 14.91 días y BALHF 6 Log UFC, 10.20 días; a una temperatura de almacenamiento de 4°C.

El análisis de los resultados encontrados requiere de algunas consideraciones que se tomaron en cuenta cuando se utilizó el test de aceleración para ver el comportamiento de las BMA, en las hamburguesas de carne. El principal componente básico de la hamburguesa es la carne y su uso debe guardar una carga microbiana por debajo de la exigencia de la NTP, así como mantener una matriz sólida y no particulada antes de la elaboración del producto. Hugas, (1998) manifestó que “específicamente en la carne fresca son varios los factores que pueden interferir con la actividad de la bacteriocina como su inactivación por las proteasas endógenas de la carne y/o la adsorción de las bacteriocinas a la carne o a las partículas de materia grasa. También pueden interferir factores como cambios en la matriz alimentaria (degradación de proteínas), cambios en la flora microbiana durante la maduración, aumento del número de microorganismos en la carne por contaminaciones externas, requerimientos de componentes específicos para su acción, entre otros”.

Cuando se realizó la prueba de vida útil acelerada, los parámetros de calidad y seguridad microbiana se designó a las BMA cómo factor prioritario para la vida útil de las hamburguesas de carne debido a que es el grupo bacteriano de origen natural e inevitable cuyo crecimiento está relacionado a la temperatura de conservación del producto. Así mismo se seleccionó al incremento de la población de las BMA como el indicador del deterioro clave que será la causa de la pérdida de calidad y la inaceptabilidad del producto por parte del consumidor

y considerarlo como el factor cinéticamente activo deseado para la aceleración del proceso de deterioro.

El análisis de los resultados permite establecer que el tiempo de vida de las hamburguesas de carne está dependiendo del nivel inicial de contaminación de las hamburguesas de carne. La carga microbiana inicial estuvo controlada en todos los tratamientos con niveles aproximados de BMA de 3 Log UFC/g. Esta condición es necesaria cumplirla debido a que la carga inicial de los alimentos no está bien controlada en alimentos reales y altera los valores reales del tiempo de vida útil. (Maxcy y Wallen., 1983). Se pudo establecer un valor inicial de BMA relativamente estable utilizando el sistema de análisis de riesgos y puntos de control crítico (HACCP) y los procedimientos de buenas prácticas de fabricación (BPM) y teniendo en cuenta la vida útil requerida para un mercado en particular.

Finalmente se realizó el estudio cinético del proceso de impacto de los bioconservantes cuya frecuencia de muestreo fue cada 24 horas durante 10 días, por considerar que la tasa de crecimiento fue lenta. Se determinó la vida útil en condiciones normales de almacenamiento a temperatura de 4 °C utilizando el modelo de Arrhenius para predecir la vida útil bajo condiciones reales posibles de almacenamiento.

En este punto, los resultados hallados permiten inferir que la biopreservación está referido a la extensión de la vida útil de los alimentos y al aumento de la seguridad microbiológica usando una microflora natural o controlada y sus productos antibacteriales presentes en la matriz de las hamburguesas, opinión concordante con la de Lewus y Montville, (1991, HUGAS y col. 1998, Chen. 2003)

*Extensión de la vida útil de las hamburguesas de carne utilizando células activas de bacterias ácido lácticas homofermentativas (BALHM)*

El estudio tuvo como objetivo principal determinar la vida útil de las hamburguesas de carne incorporando en su formulación artesanal como bioconservantes: a un cultivo puro de BALHF viables, para que de esta forma se genere directamente bacteriocinas en las Hamburguesas, en la medida de que su matriz le permita crecer en las condiciones ambientales y tecnológicas. Para el caso de las hamburguesas la calidad microbiológica de la carne es fundamental a fin de que, los cultivos biopreservadores o fermentadores puedan competir con la microflora natural y sobre todo no deben ser factor de alteración de las propiedades fisicoquímicas y organolépticas del alimento. (Castellano, 2008).

El uso del cultivo bioprotector BALHF a un nivel de concentración de 6 Log UFC, incorporados en la matriz de las hamburguesas permite una extensión de la vida útil por 10.20 días; a una temperatura de almacenamiento de 4°C.

Yacoob y Hassen, (2019) demostraron que “el número total de bacterias en las tabletas de carne donde el número de bacterias aumentó en el segundo día de almacenamiento en el tratamiento control a  $63.67 \times 10^4$  UFC/g en comparación con los probióticos únicos y mixtos  $31.67 \times 10^4$  UFC/g,  $25.03 \times 10^4$  UFC/g respectivamente. Se observó que el recuento total de bacterias en el tratamiento de control aumentó y excedió los límites de los estándares en el séptimo día y, por lo tanto, se excluyeron porque no eran aptos para el consumo humano debido a la contaminación, mientras que los tratamientos con probióticos únicos y mixtos preservaron las tabletas de carne congelada durante 10 días, manteniendo el número de bacterias dentro de los límites estándar, observándose la superioridad de los probióticos mixtos en el resto de los tratamientos. Por lo tanto, puede usarse con éxito para inhibir el crecimiento de bacterias dañinas y mantener la calidad de la carne congelada durante el mayor tiempo posible de almacenamiento”.

Asraa et,al 2019, estudió el efecto de adicionar bacterias prebióticas sobre las características microbianas y organolépticas en carne para hamburguesas, encontrando que “el número de bacterias psicrófilas en la muestra de control

en el segundo día de almacenamiento aumentó y alcanzó  $55.33 \times 10^4$  ufc/g en comparación con los tratamientos con probióticos individuales y mixtos que alcanzaron  $25.02 \times 10^4$  ufc/g,  $28.37 \times 10^4$  ufc/g respectivamente. El tratamiento control se excluyó el día 7 de almacenamiento, donde el número de bacterias psicrófilas excedió las especificaciones estándar del número de bacterias psicrófilas que alcanzó  $11.01 \times 10^4$  cfu / g, mientras que las muestras de los probióticos individuales y mixtos los tratamientos se mantuvieron dentro de los límites de 7, 9 y 10 días del período de almacenamiento, su media alcanzó el día 10,  $7,21 \times 10^5$  UFC/g,  $72,37 \times 10^5$  UFC/g respectivamente. El undécimo día, el número de bacterias psicrófilas en las muestras de tabletas de carne excedió la calidad estándar, por lo que el probiótico trabajó en mantener las tabletas de carne en el refrigerador durante diez días” Se asume que es “debido a que ellos producen sustancias antimicrobianas que inhiben a las bacterias nocivas”. (Knipe CL. 2009)

Jurado y col. (2011) evaluaron el efecto de bioconservación de hamburguesa de cerdo (HC) con *L. acidophilus* ATCC 4356 y *S. carnosus* NRRLO2. El análisis microbiológico mostró que el recuento de mesófilos totales reportó valores superiores a  $10^7$  ufc/mL en todas las muestras, correspondiendo con los análisis efectuados para el conteo de BAL en MRS, lo que sugiere que los mesófilos presentes corresponden a las BAL presentes en el inóculo aplicado a las HC. El conteo de coliformes totales y fecales alcanzó valores de  $<3$  UFC/g durante un período de 30 días, a temperatura ambiente por la acción inhibitoria de las bacterias lácticas (BAL), debido a su producción de ácido láctico y otros compuestos inhibidores secretados por los microorganismos. Se observó que ambas cepas fueron resistentes a pH ácido y que no hay efecto antagónico entre ellas. Los resultados obtenidos muestran el uso potencial de este método de conservación como alternativa a la cadena de frío.

Angiolillo y col., (2017) “investigaron la idoneidad del pescado bajo la forma de hamburguesa como sustrato para ser fortificado con una cepa bacteriana probiótica: *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) micro encapsulado para evitar la pérdida de viabilidad bacteriana durante la cocción. Los resultados demostraron

que las bacterias aeróbicas en las muestras crudas el crecimiento es inmediato, alcanzando el límite microbiano después de 9.08 días y, por lo tanto, más rápido con respecto a la muestra de hamburguesas no cocinadas con 10 % de microcápsulas con LGG que alcanzó el límite microbiano 2 días después. Por lo tanto, se encontró que la adición de microcápsulas probióticas tenía una actividad antimicrobiana además de su actividad funcional primaria.

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 y oxígeno, competición por la adhesión al sustrato y producción de una amplia gama de sustancias inhibitorias, principalmente ácido láctico o acético, diacetilo, peróxido de hidrógeno, reuterina, 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 con la microflora nativa (Pérez-Chabela y col., 2000).

El uso de LAB como cultivo bioprotector en carnes trae ciertas ventajas, pues el efecto en las características sensoriales es considerado "oculto" o no percibido durante la maduración, debido al bajo contenido de hidratos de carbono y la fuerte capacidad amortiguadora de la carne. Estas bacterias no producen un cambio drástico de las características sensoriales en comparación a los cambios que tienen lugar en la leche y hortalizas fermentadas. No obstante cuando se van a utilizar cepas bioprotectoras en carnes y sus derivados, los cultivos microbianos deben cumplir características importantes como mantener su efecto inhibitorio a bajas temperaturas y causar un efecto insignificante en el pH de la carne (Castellanos y col., 2008).

La calidad microbiana natural y el alcance de la contaminación superficial de la carne cortada determinarán la vida útil potencial de las hamburguesas de carne.

Al respecto Borch y col. (1996) indican que “durante el almacenamiento en frío, el número de microorganismos en las superficies de carne fresca cambia siguiendo un patrón típico de crecimiento microbiano en respuesta a la temperatura, el pH y la disponibilidad de oxígeno, pero solo alrededor del 10% de las bacterias inicialmente presentes son capaces de crecer durante el almacenamiento refrigerado de carne y la porción microbiana que causa el deterioro es aún menor”.

Altamirano y col. 2019. “determinó la dosis de consorcio microbiano (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*) y la temperatura de almacenamiento que garantice la prolongación de la vida útil de una longaniza artesanal. La mayoría de los tratamientos no presentaron cargas logarítmicas mayores a las permitidas por la norma INEN 1338:2012 respecto a los microorganismos analizados cuantitativamente (*Aerobios mesófilos*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*), identificando al tratamiento 10 mL de consorcio microbiano a 6°C de temperatura de almacenamiento como el mejor a nivel microbiológico por presentar mayor capacidad antimicrobiana con una vida útil de 63 días.

En base a las evidencias científicas encontradas, el presente estudio concuerda con Selgas y col.(1993).quienes han demostrado que algunos géneros de BAL se unen a carbohidratos específicos de entero bacterias e inhiben su adhesión mediante agentes antimicrobianos y la producción de sustancias de bajo peso molecular, produciendo efectos tóxicos sobre otras bacterias al adherirse a receptores de sus superficies”, . Además, estudios previos han logrado la inocuidad de algunos alimentos mediante el uso de una microbiota nativa como las BAL aislada de productos lácteos, cárnicos, pescados, vegetales; generando cambios en la población microbiana intestinal e inhibiendo microorganismos patógenos; por tanto, se les ha descrito como inmunoestimulantes, lo cual favorece al consumidor al mejorar su sistema inmune, mantener el equilibrio bacteriano normal, mejorar la digestión, ayudar a tolerar la lactosa y evitar enfermedades como la diarrea (Aymerich y col. 1996).

*Extensión de la vida útil de las hamburguesas de carne utilizando lactosuero 2.5% ácido láctico.*

El presente estudio considero como posibilidad el uso del suero lácteo desproteínizado como una forma para extender el tiempo de vida útil de las hamburguesas de carne.. El lactosuero o suero lácteo utilizado es la porción acuosa de la leche que es separada de la cuajada después de la fermentación con adición de BALHF, elaborada con motivo de la investigación. Posteriormente se sometió a un proceso de esterilización y separación del suero lácteo desproteínizado, para ser utilizado de inmediato en la matriz cárnica usada para la elaboración de las hamburguesas.

Como respuesta al uso del suero lácteo, con un contenido de 2.5% de ácido láctico, permitió a las Hamburguesas un incremento del tiempo de vida útil hasta 33.74 días. Este valor es el más elevado que se consiguió, comparativamente ( $p < 0,05$ ) es mayor frente a BALHF 6 Log UFC/g y Nisina 800 ppm, conservada a 4 °C.

En la industria alimentaria se permite adicionar algunos ácidos orgánicos como el ácido láctico, que debido a sus concentraciones y la naturaleza del producto tiene un comportamiento efectivo pero variable en cuanto al tiempo de vida útil según muchos autores. Se utilizó un suero lácteo desproteínizado cuya concentración de ácido láctico fue 2,5%.

El impacto del ácido láctico sobre las BMA es sustantivo permitiéndole a las hamburguesas de carne una extensión de vida útil mucho mayor que las células activas de BALHF y Nisina, en es orden, Autores como el de Podolak y col., (1996), estudiaron los efectos del ácido fumárico y láctico en el número total de bacterias aeróbicas, psicrotróficas y coliformes en empanadas de carne molida empaquetadas al vacío por 14 días de almacenamiento a 4°C disminuyó significativamente el crecimiento de los coliformes, lo que resultó en una reducción de 3.88 unidades logarítmicas después de 10 días de almacenamiento. En base al recuento de aerobios mesófilos se estableció una

vida útil inferior a 10 días para las hamburguesas envasadas a vacío y a 14 días para las envasadas en atmósfera modificada.

Del mismo modo, Ojeda y Vasquez. (2008) “Utilizaron ácidos orgánicos en la reducción de Coliformes totales en piezas de carne de ovino. Los tratamientos Acido peracético 200 ppm y Ácido láctico 2% v/v lograron la mayor reducción logarítmica, 1,39 y 1.36, respectivamente; otorgándoles una estabilidad por 10 días en condiciones de refrigeración”. La acción bactericida del ácido láctico sobre las bacterias Gram negativas, especialmente el grupo de las Enterobacterias, se debe a que produce una desorganización de la capa de lipopolisacáridos presentes en la superficie de la membrana externa, los cuales se encargan de la permeabilidad de barrera de la misma. Roth y Keenan. (1971).

Di Schiavi y col., (2015), “demostró la disminución de la carga bacteriana al comparar el tratamiento control y al utilizar el ácido láctico 2%, observaron en todos los casos que la carga bacteriana desciende a través de 7 días. El mayor descenso se observa contra el desarrollo de mesófilos en Pechuga, descendiendo la carga microbiológica en el orden de 2,01 log., y en Pata-Muslo descendiendo la carga microbiológica en el orden de 3,22 log. Se observa también un descenso marcado contra el desarrollo de Enterobacterias en Pata-Muslo descendiendo la carga microbiológica en el orden de 2,34 log”.

Signorini y col., (2002), aplicaron una solución de ácido láctico (200 mg/100 g de carne) que logró controlar la cuenta de enterobacterias, *Pseudomonas* spp., *B. thermosphacta* y bacterias lácticas heterofermentativas en carne bovina, observándose reducciones de 2.0, 1.1 y 1.0 logUFC/g respectivamente, cuando la carne se almacenó bajo refrigeración por 10 días y reducciones de 2.5, 2.0, 1.5 y 0.5 logUFC/g respectivamente cuando la carne fue sometida a abusos térmicos, donde adicionalmente se pudo comprobar la eficiencia de este ácido orgánico para reducir los niveles de histamina, putrescina y tiramina en carne bovina almacenada a 4 y 20 °C.

Dong-Hyun K. y col., (2001). “estudiaron la conservación de la carne de vacuno no inoculado, producido comercialmente, de tamaño irregular (rango, 100 a 400 cm<sup>2</sup>) utilizando un proceso antimicrobiano multi hilera bajo un sistema de pulverización utilizando lavados de agua a presión 65 psi y 30 psi, 65 °C y 51 °C, ácido láctico 2% vol/vol. El recuento inicial de microorganismos mesófilos aerobios Totales (MMAT) fue 2.73 log UFC/g se redujo (P, 0.05) a 0.26 log UFC/g por el tratamiento. Durante 5 días el recuento de MMAT en la carne molida permaneció por debajo de 1.0 log UFC/g y luego aumentó a 6.9 log UFC/g por 20 días de almacenamiento a 4°C, mientras que el recuento MMAT de las muestras de control aumentaron de 2.73 log a 8.19 log UFC/g después de 20 días de incubación a 4°C. Después de 20 días de incubación, la diferencia en el número de MMAT fue de aproximadamente 1.2 unidades logarítmicas entre la carne molida tratada y la de control”.

El tiempo de vida obtenido para las hamburguesas de carne puede utilizarse como bioconservante y esta condición se puede explicar reconociendo la acción bactericida del ácido láctico, presente en el suero lácteo desproteínizado, lo que sugiere tratar de aprovecharlo en las hamburguesas de carne, que muchas veces, se elabora de forma artesanal. La exigencia para estimar el tiempo de vida útil requiere, en primera instancia, controlar la carga microbiana de tipo alterante debido a que ésta determinará el efecto del ácido láctico sobre el crecimiento de las BMA en condiciones de conservación a 4 °C. Además, el tiempo de vida útil está en relación directa con la concentración del ácido láctico y ésta con el valor de pH de la matriz del producto. El valor de éste parámetro, en condiciones post mortem, está en función de las concentraciones de ácido láctico que se genera a partir del glucógeno remanente, en la glucólisis anaerobia, estableciendo un pH de 5.6-5.7 (Hultin, 1993).

El comportamiento físico químico de la hamburguesa es determinante para la existencia y desarrollo de la carga microbiana y ésta proviene desde la muerte del animal en condiciones de estrés o agotamiento, motivo por el cual la concentración de glucógeno y ácido láctico son mínimos, razón por la cual el pH final de la carne puede encontrarse entre 6 -6.5. Los microorganismos mesófilos

aerobios tienen su pH óptimo cercano a pH 7, por lo tanto ellas tendrán todas las condiciones para su multiplicación. En este estudio el crecimiento de las BMA se desarrollaron a una velocidad de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) de **0.015** Log UFC/g/d conservadas a temperaturas de abuso de 4 °C; valor considerado como muy bajo, demostrándose así el efecto inhibitor del crecimiento de las BMA presentes en las hamburguesas de carne.

Actualmente se tiene diversas propuestas para explicar el mecanismo de la actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos; sin embargo, hay consenso en que el ácido orgánico se “difunde a través de la membrana celular bacteriana en su estado no disociado facilitado por su carácter lipofílica. Al ingresar al citoplasma, éste presenta un pH superior al exterior haciendo que ácido se disocie y de esta forma volver a reestablecer el equilibrio (disociado/no disociado) liberando al exterior grupos H<sup>+</sup>, o protones, acidificándolo. Cuando la concentración de protones excede la capacidad tampón del citoplasma se transportan hacia el exterior mediante bomba de protones, reduciendo de esta manera las reservas energéticas de la célula. Cuando estas reservas se agotan, la bomba de protones se detiene y se provoca el descenso del pH interno, lo cual causa a su vez desnaturalización de las proteínas y desestabilización de otros componentes estructurales y funcionales de las células, interfiriendo así con la viabilidad”. (Requena y col., 1995; Urrego y col., 2005).

Otra teoría establece que “al incorporarse importantes cantidades de lactato al interior bacteriano modifican 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, 2004).

*Extensión de la vida útil de las hamburguesas de carne utilizando Nisina 800 ppm.*

La nisina es una sustancia polipeptídica (antibiótico) producida por diferentes cepas de *Lactococcus lactis* y *Streptococcus lactis* a partir de una fermentación

en leche modificada y contiene alrededor de treinta aminoácidos. Es un aditivo utilizado en la industria alimentaria como sustancia conservante.

Se conoce como E 234 y se utiliza en la industria alimentaria, principalmente en la fabricación de quesos y otros productos alimenticios como conservante en la prevención de posibles alteraciones y también en la protección de diversas carnes, ya sean crudas o precocidas.

La nisina es una sustancia ácida y es más estable en estas condiciones. Las soluciones de pH 2 son estables durante el almacenamiento prolongado entre 2-7 °C y pueden soportar el calentamiento hasta 121 °C sin pérdida de actividad. En condiciones alcalinas, la actividad se pierde y se destruye en 30 minutos a 63 °C y pH 11. Hay una disminución parcial de la actividad cuando se usa nisina en alimentos procesados debido al calentamiento. Las concentraciones de nisina normalmente utilizadas en la conservación de alimentos son totalmente solubles en agua y otros líquidos de procesamiento y no es soluble en solventes no polares.

Hace pocos años atrás, la industria de los productos cárnicos procesados ha tenido una gran expansión y aceptación por una variedad de consumidores a nivel mundial. Las hamburguesas como producto cárnico, además del aspecto nutritivo y sensorial se le exigen la conveniencia de preparación del producto, la seguridad alimentaria y el periodo de vida de anaquel a fin de cumplir con los atributos de su calidad. Para la conservación de estos productos, el uso de conservadores naturales es una fuerte tendencia mundial, siendo el de mayor potencial las bacteriocinas. (Sanchez y col. 2019)

Por los resultados obtenidos en este estudio, se acepta el criterio que la nisina posee propiedades antimicrobiana y su efectividad en matrices cárnicas está relacionado a factores intrínsecos y extrínsecos, motivo por el cual la literatura existente sobre el uso de la nisina es variable y en algunos casos contradictorios; sin embargo cada estudio demarca sus objetivos de su interés y entrega resultados

que cada vez aproxima al un uso conveniente y apropiado a cada producto cárnico..

El presente estudio experimentó con hamburguesas de carne en las cuales se les incorporó nisina 800 ppm y luego se sometieron a temperaturas de abuso de 15, 25 y 45 °C, midiendo cada día el crecimiento Log UFC/g de las BMHF por el periodo de 10 días y de esta forma cumplir con las exigencias del modelo de Arrhenius y obtener su tiempo de vida útil.

Los resultados de las curvas de crecimiento tuvieron diferencias significanticas ( $p < 0.05$ ) siendo la curva de crecimiento en la que se demuestra que es más efectiva en disminuir el crecimiento de BALHF es la temperatura de 15 °C, en la cual la velocidad de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) es de 0.196 Log UFC/g/d, valor que indica un crecimiento lento, otorgando a la hamburguesas un tiempo de vida útil de 14.91 días, conservadas a 4°C.

Estudios semejantes sobre la eficiencia de la nisina en productos cárnicas los encontramos en, Chung et al. (1989) que “encontró que la concentración de  $10^4$  UI/ml de nisina retrasaron el crecimiento bacteriano en las carnes que habían inoculado artificialmente con *L.monocytogenes*. Durante las dos semanas de almacenamiento de las carnes a 5 ° C, la nisina causó una reducción de 2-4 log ufc/cm<sup>2</sup> en el número de *L. monocytogenes*.

Gomez y col., (2013) evaluaron y compararon el efecto de la adición de nisina, lactatos y acetato-lactato sobre el crecimiento de patógenos como *Escherichia coli* y de microorganismos contaminantes naturales presentes en la carne, así como también sobre la vida de anaquel de la carne molida de res mantenida en refrigeración. Observaron que el mayor control del crecimiento de *E. coli* ( $P < 0.05$ ) después de ocho días en refrigeración fue con el tratamiento de nisina y ácidos orgánicos, en el cual el conteo medio fue de 3.74 log<sub>10</sub> UFC/g. Considerando el conteo inicial de *E. coli* en la carne molida antes del

almacenamiento (tiempo 0 días) de 7.03 log<sub>10</sub> UFC/g, el tratamiento con nisina proporcionó una reducción logarítmica media de 3.29 log<sub>10</sub> UFC/g.

Kara y col. (2014), investigaron el efecto de la nisina sobre el crecimiento y la supervivencia de *L. monocytogenes* (ATCC 7644) (Lm) en muestras de hamburguesas de pollo en las cuales se inocularon con Lm en los niveles de 4 log ufc/g y 6 log cfu/g y se agregaron nisina en cantidades de 25 µg/g, 50 µg/g y 100 µg/g para formar ocho grupos experimentales combinando concentraciones de Lm 4 log ufc/g y 6 log cfu/g contra 25, 50 y 100 ppm de nisina; además de controles Lm: 4 y 6 Log ufc/g, sin agregado de nisina. Se almacenaron a 4 ° C durante 7 días. El número de *L. monocytogenes* se redujo en promedio 1-2 log ufc/g en las hamburguesas de pollo experimentales. Por lo tanto, podría ser necesario explorar otras cantidades diferentes de nisina para garantizar las posibilidades de usar nisina en la carne y los productos cárnicos.

Alcivar y Espinoza, 2018 . “evaluaron los efectos del uso la Nisina como conservante natural en las características microbiológicas y organolépticas en el salami y como sustituto total del nitrito. Los porcentajes de Nisina utilizado fueron 0,0025, 0,005, 0,0075, 0,010. Se evaluaron las variables microbiológicas: Salmonella, Clostridium perfringens y Staphylococcus aureus. Como resultado se obtuvo que el mejor tratamiento con una dosis de Nisina de 0,010%. A este tratamiento se le realizaron análisis microbiológicos después de 30 días para determinar si la Nisina seguía actuando y se comprobó que hubo contaminación de Staphylococcus aureus. Se pudo concluir que el uso de Nisina es idóneo en productos cárnicos crudo madurados pero en dosis iguales o mayores a 0,010%”.

Moreno, (2012), investigó la reducción de carga microbiana en la carne de pollo mediante el uso de bactericidas orgánicos, se seleccionó dos agentes antimicrobianos: el ácido láctico y la Nisina que afecta a microorganismos Gram (+). Se elaboró varias soluciones con ácido láctico al 1% y 2% y nisina con 300 y 500 ppm y el tiempo de inmersión de 5 y 10 minutos, con temperaturas de almacenamiento de 4 y 18 °C. Se determinó la tasa de supervivencia de tres

tipos de microorganismos característicos Aerobios Totales, Coliformes Totales y la presencia de E.coli en pechugas de pollo recién sacrificadas. El mejor tratamiento es el utilizar 1% de ácido láctico, 500 ppm de nisina por un tiempo de inmersión de 10 minutos a una temperatura de refrigeración de 4°C, tratamiento que extiende el tiempo de vida útil del producto a 14 días.

Cáceda (2018), investigó el “efecto de diferentes concentraciones de nisina (500 UI/mL, 1000 UI/mL y 1500 UI/mL) sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* en carne de res cruda. A medida que la concentración de nisina aumentaba, el grado de inhibición del crecimiento aumentaba de manera similar. Recuento de *L. monocytogenes* ATCC 19114 (log ufc/g), incubadas a 4 °C en el grupo control fue de 3.2 al inicio y al 5to día 5.6; y en el grupo de la carne de res cruda con tratamientos de 1500 UI/mL de nisina, fue 3.2 al inicio y 1.8 al día 5, siendo éste tratamiento que tuvo mayor inhibición en el crecimiento”.

Kara y col. (2014). Investigó el efecto de la nisina sobre el crecimiento y la supervivencia de *L. monocytogenes* en muestras de hamburguesas de pollo que fueron inoculadas con *L. monocytogenes* (ATCC 7644) (Lm) a niveles de 4 log ufc/g y 6 log cfu/g y se agregaron nisina en cantidades de 25 µg/g, 50 µg/g y 100 µg/g. No se agregó nisina al grupo de control. Se almacenaron a 4 °C durante 7 días. Las cantidades de nisina utilizadas no inhibieron totalmente. *L. monocytogenes*, el número de *L. monocytogenes* se redujo en promedio 1-2 log ufc/g en las hamburguesas experimentales de pollo. Por lo tanto, podría ser necesario explorar otras cantidades diferentes de nisina para garantizar las posibilidades de usar nisina en la carne y los productos cárnicos.

Durante la evaluación de un cultivo productor de bacteriocinas para la fermentación de embutidos o para la biopreservación, es necesario considerar que la carne o los productos cárnicos son sistemas complejos con un número de factores microbianos que influyen el crecimiento y la producción metabólica. Lo anterior indica que el desempeño de los cultivos productores de bacteriocina requieren ser comprobados antes de su aplicación en alimentos para determinar

la influencia que tienen sobre ellos los componentes de la formulación y de la tecnología de fermentación (Hugas, 1998).

Suarez y col., (2008), “evaluó el potencial de biopreservación de un extracto crudo de bacteriocinas producidas por una cepa nativa de *Lactobacillus plantarum* LPBM10, sobre filetes del híbrido de cachama *Piaractus brachypomus* x *Colossoma macropomum* empacados al vacío durante 30 días de almacenamiento a  $3\pm 0.5$  °C. Se evaluaron tres tratamientos: extracto crudo de bacteriocinas, ácido láctico y el control. El recuento de heterótrofos no presenta diferencia entre los tratamientos, mientras el recuento de psicrótrofilos alcanza valores de 5.2 ciclos log, 6.7 ciclos log y 6.4 ciclos log ( $P < 0.05$ ) para los filetes tratados con extracto crudo de bacteriocinas, ácido láctico y control, respectivamente. Con respecto a los coliformes totales se obtiene un recuento inicial de 2.6 ciclos log, el cual no cambió durante todo el estudio. En cuanto al recuento de coliformes fecales, al finalizar el periodo de almacenamiento, disminuyó 1.3, 1.5 y 2.1 ciclos log para los filetes control, tratados con extracto crudo de bacteriocinas y ácido láctico, respectivamente”.

Günes y Çibik (2002) informaron “que las muestras de albóndigas de 1negöl que habían contaminado experimentalmente con *L. monocytogenes* y luego inoculadas con 50 µg / g de nisina dieron como resultado una reducción de 3 log ufc/g en el número de *L. monocytogenes*, mientras que 25 µg / g nisina resultó en una disminución de 1 log cfu/g en el número de *L. monocytogenes*. La adición de nisina a los niveles de 1 y 5 µg / g no causó ninguna reducción en el número de *L. monocytogenes*”.

Hampikyan y Ugur (2007) “contaminaron muestras de soujouk fermentado turco (salchicha fermentada) con *L. monocytogenes* al nivel de 6 log cfu/g, y probaron 5, 10, 25, 50 y 100 µg/g de nisina en varios grupos. El número de *L. monocytogenes* se redujo aún más a medida que aumentó la concentración de nisina”.

Ruiz y col. (2009) “inocularon muestras de jamón de pavo en cubitos listos para comer con un cóctel de 5 cepas de *L. monocytogenes*, trataron las muestras con 0,5% de nisina y luego las envasaron al vacío y las almacenaron durante 63 días a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La nisina redujo *L. monocytogenes* en 4.42 log ufc/g en comparación con el control positivo. El día 0, los recuentos de *L. monocytogenes* se mantuvieron por debajo de 2,75 log ufc/g para las muestras de jamón de pavo tratadas con nisina. Aunque el tratamiento con 0,5% de nisina no eliminó completamente *L. monocytogenes*, los niveles bajos indican que la nisina puede reducir significativamente los recuentos de *L. monocytogenes* en muestras de jamón de pavo listas para comer en condiciones similares”.

Hugas, (1998) “Específicamente en la carne fresca son varios los factores que pueden interferir con la actividad de la bacteriocina como las proteasas endógenas de la carne y/o la adsorción de las bacteriocinas a la carne o a las partículas de materia grasa, cambios en la flora microbiana durante la maduración, aumento del número de microorganismos en la carne por contaminaciones externas, requerimientos de componentes específicos para su acción, entre otros”.

Aunque, Reunanen y Saris (2004) “concluyeron que la nisina puede tolerar el proceso de cocción de la salchicha y tiene una vida útil razonablemente larga en las salchichas cocidas almacenadas en frío, lo que la convierte en un conservante de alimentos útil. otros investigadores han afirmado que el uso de la nisina en la carne como un conservante ha tenido poco éxito debido a la interferencia de los componentes de la carne, como los fosfolípidos y el pH alto”. En tales condiciones, “la nisina se vuelve mucho menos soluble, lo que indica la limitación de la aplicación de nisina” (O'Sullivan et al., 2002; Liu y Hansen, 1990; Aasen et al., 2003; Rose et al., 2002, Yonema et al., 2004).

Gálvez y colaboradores (Gálvez y col, 2007) mencionan que “la biopreservación usando bacteriocinas producidas in situ, ofrece varias ventajas comparadas a la producción ex situ, concernientes al aspecto legal y de costos. Disminuir los

costos en los procesos biopreservativos puede ser altamente atractivo, especialmente para economías pequeñas y países en desarrollo, donde la seguridad alimenticia puede estar altamente comprometida. La evaluación del potencial bactericida de los extractos crudos de BAL sobre el crecimiento de microorganismos deteriorantes y patógenos, ha presentado resultados favorables, por lo que han sido recomendados recientemente por varios autores como método de Biopreservación en alimentos” (Castellanos y col.,2008, Fiorentini y col.,2001, Suarez y col.,2008).

“La nisina tiene muchas ventajas sobre otros conservantes de alimentos, como su no toxicidad, digestibilidad inmediata por la enzima  $\alpha$ -quimotripsina, estabilidad al calor a un pH bajo y ausencia de color y sabor” (Pongtharangkul y Demirci, 2004). “Durante décadas, se ha observado que la nisina es efectiva. Por ejemplo, Chung et al. (1989) encontraron que  $10^4$  UI/ml de nisina retrasaron el crecimiento bacteriano en las carnes que habían inoculado artificialmente con *L.monocytogenes*. Durante 15 días las carnes almacenadas a 5 °C, la nisina causó una reducción de 2-4 log ufc/cm<sup>2</sup> en el número de *L. monocytogenes*”.

Existe información científica que indican que el efecto antimicrobiano de la nisina tiene sus limitaciones y que se logra mayor efectividad por mecanismos de sinergia o complementaria cuando impacta a bacterias patógenas, sobre todo.

En ese sentido tenemos el reporte de Alba y col. (2012), quienes “investigaron el efecto antimicrobiano de los tratamientos con alta presión hidrostática (HHP), bacteriocinas y sus combinaciones sobre *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli* O157: H7 en Carpaccio de res curado, almacenado a 8 °C, durante 30 días, las bacteriocinas redujeron los recuentos de *Listeria* en 0.1 a 1.5 unidades logarítmicas, siendo la pediocina comercial la más efectiva contra *L. monocytogenes*.

Los efectos observados en esta investigación se explican por los estudios basados en las características catiónicas e hidrofílicas de la nisina. Se ha

demostrado que son dos los mecanismos que explican el modo de acción de la nisina sobre la permeabilización de la membrana celular bacteriana.

En un primer paso, las bacteriocinas actúan como un complejo de “poración” en el cual los monómeros de la misma se unen, insertan y oligomerizan en la membrana citoplasmática para formar un poro y, en segunda instancia, las bacteriocinas desestabilizan la membrana a modo de un detergente. Los resultados de muchos estudios tienden a apoyar el modelo de la formación de poros sobre el que propone una acción tipo detergente. Así mismo, la nisina posee una carga positiva que incrementa su interacción con las cargas negativas de los componentes de la pared celular.

En el segundo paso, la nisina se une al lípido II, principal transportador de las subunidades de peptidoglucano del citoplasma a la pared celular interfiriendo con su síntesis, lo que lleva a la bacteria a muerte celular. En el tercer paso, varias moléculas de nisina utilizan al lípido II para fijarse e insertarse en la membrana celular y empezar la formación de poros, con lo cual se produce en la muerte celular de la bacteria

Teniendo en cuenta los resultados de los estudios anteriores se puede afirmar que la biopreservación ya sea usando las cepas activas protectoras de Bacterias ácido lácticas homofermentativas aplicadas en forma directa, Suero de leche desproteínizado con 2.5 % y Nisina 800 ppm/g, son un métodos de conservación que usado junto a las Buenas Prácticas de Manufactura y el Sistema HACCP, pueden alargar la vida útil de carnes y sus derivados.

El desarrollo matemático del modelo de Arrhenius permitió obtener el tiempo de vida útil de las hamburguesas de carne tratadas con productos orgánicos de Bacterias ácido lácticas homofermentativas, observándose que el mayor tiempo de bioconservación la registra el Lactosuero al 2% que permite una vida útil de 33.74 días, seguida de la Nisina 14.91 días y Log UFC  $10^6$ , 10.20 días; a una temperatura de almacenamiento de 4°C..(Tabla 8)

### 6.3 Responsabilidad ética

Este estudio no requirió aprobación ética ya que la recolección de muestras provenía de animales sacrificados con fines alimenticios. Todos los otros experimentos fueron in vitro.

Así mismo, el manuscrito fue preparado y revisado por el autor, motivo por el cual declaro que no existe ningún conflicto de intereses, que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados, por lo cual, el autor se responsabiliza por la información contenido en el presente informe-

## **CONCLUSIONES**

Los productos orgánicos aplicados en este estudio impactan sobre las bacterias mesófilas aerobias presentes en las hamburguesas de carne disminuyendo la velocidad de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) y aumentando el tiempo de adaptación ( $\mu$ ).

Las bacterias mesófilas aerobias (BMA) son, mayoritariamente, sensibles a los biopreservantes orgánicos procedentes de fermentaciones homolácticas y deben ser considerados preferentemente para estudios de vida útil en productos cárnicos.

El suero lácteo brinda a las hamburguesas una extensión de su vida útil mucho mayor que los otros bioconservantes utilizados debido a la cantidad y calidad de las BMA y la condiciones intrínsecas de la matriz de la hamburguesa.

Los modelos matemáticos de Baranyi & Robert y Arrhenius fueron de gran utilidad para estimar los parámetros del crecimiento de las bacterias mesófilas aerobias y tiempo de vida útil.

## **RECOMENDACIONES**

Realizar ensayos con sueros lácteos provenientes de la fermentación con especies de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico.

Aplicar las herramientas multimediales de la Microbiología predictiva para estudios de vida útil usando modelos secundarios que permiten relacionar el crecimiento microbiano con dos o más variables de naturaleza extrínseca.

Continuar con estudios de microorganismos indicadores en productos cárnicos que se conservan a bajas temperaturas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alba María, Bravo Daniel, Medina Margarita. **High-pressure treatments on the inactivation of *Salmonella enteritidis* and the characteristics of beef carpaccio**. Meat Science Volume 92, Issue 4, December 2012, Pages 823-828
- Alcívar Alcívar g., Espinoza Zambrano A. **Características microbiológicas y organolépticas del salami aplicando nisina como conservante natural**. Tesis. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí. Calceta. Ecuador. 2018.
- Altamirano Rodríguez, Danny José, Chavarría Chavarría Manuel Antonio. **Dosis de consorcio microbiano y grado de temperatura en la vida útil de una longaniza artesanal**. Tesis Maestría. Escuela superior politécnica agropecuaria de manabí Manuel Félix López.. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria "Manuel Félix López". Calceta, Ecuador. 2019.
- Angiolillo L, Danza A, Conte A, Del Nobile MA (2017). **How to Fortify a Fish Burger with Probiotic Microorganisms**. J Prob Health 5: 177.
- Asraa Yacoob Yousif\*, Eftekhar Hassen Muhssen. **The Effect of Adding Probiotics on Microbial and Organoleptic Characteristics of Beef Burger**. Product. Journal of Global Pharma Technology. 2019. Vol. 11. Issue 09 (Suppl.).152-157
- Aymerich M.T., Hugas M. 1998. **Estado actual de la bioconservación en productos cárnicos**. Eurocarne 72: 39-49.

- Aymerich T., Holo H., Havarstein L.S., Hugas M., Garriaga M.1996. **Biochemical and genetic characterization of Enterocin A from Enterococcus faecium a new antilisterial bacteriocin in the Pediocin family of bacteriocins.** Applied and Environmental Microbiology 62 (5): 1676-1682.
- Bhandare S.G., A. Sherikar, A. Paturkar, V. Waskar, R. Zende (2007). **A comparison of microbial contamination on sheep/goat carcasses in a modern Indian abattoir and traditional meat shops.** Food Control 18: 854-858.
- Bolton D.J., Catarama T. , Byrne C., Sheridan J.J., McDowell D.A. and Blair I.S.. **The ineffectiveness of organic acids, freezing and pulsed electric fields to control Escherichia coli O157:H7 in beef burgers.** Letters in Applied Microbiology 2002, 34, 139–143
- Breukink E., Wiedemann I., Van Kraaij C., Kuipers O. P., Sahl H. G., Kruijff B. 1999. **Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic.** Science, 286(5448): 2361-2364.
- Buchanan, R.L. (1993) **Predictive food microbiology.** Trends Food Sci. Technol. 4, 6-11
- Buchanan, R.L. and Phillips, J.G. (1990). **Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, & nitrite concentration, and atmosphere on the growth of Listeria monocytogenes.** J. Food Prot. 53,370-376,381
- Buchanan, R.L., Stahl, H.G. and Whiting, R.C. (1989) **Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride, and sodium nitrite on the growth of Listeria monocytogenes.** J. Food Prot. 52, 844-851

- Cáceda Cabrera J. **Efecto de la concentración de nisina sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* ATCC 19114 en carne de res cruda.** Tesis. Universidad nacional de Trujillo. Perú. p: 14-15. 2018.
- Castellano P, Belfiore C, Fadda S., Vignolo G. A. **Review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina.** Meat Sci. 2008; 79 (3): 483 - 499.
- Chandler, R.E. and McMeekin, T.A. (1989). **Combined effect of temperature and salt concentration/water activity on the growth rate of *Halobacterium* spp.** J. Appl. Bacterial. 67, 71-76
- Chen, H. & Hower, D.G. **Bacteriocins and their Food Applications.** Food Sci Food Saf 2003; 2: 82-100.
- Datta S., A. Akter, I Shah, k. Fatema, T. Islam, A. Bandyopadhyay, Z. Khan, D. Biswas. (2012). **Microbiological quality assessment of raw meat and meat products, and antibiotic susceptibility of isolated *Staphylococcus aureus*.** Agriculture, Food and Analytical Bacteriology. 2: 187-194.
- Di Schiavi, Maria de los Angeles; Rebagliati, Juan Ernesto; Libonatti, Carina. **Análisis comparativo entre ácido láctico y ácido cítrico en la desinfección de las carcasas de pollos en el sector de trozado, en una planta de faena.** 2015. Tesis. Facultad de Ciencias Veterinaria. Universidad Nacional del Centro. Tandil. Argentina.
- Dicks, L.M.T., Mellet, F.D. and Hoffman, L.C. 2004. **Use of bacteriocin producing starter cultures of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus* in production of ostrich meat salami.** Meat Science 66: 703-708

Domínguez Miguel D. C. **Efecto de la refrigeración y la aplicación de ácido láctico sobre la presencia de *Listeria monocytogenes* en canales bovinas en un centro de beneficio de Lima - Perú.** Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Facultad de Medicina Veterinaria E.A.P de Medicina Veterinaria. Lima – Perú. 2014

Fiorentini ÁM, Sant'anna Ernani S, Porto Anna C.S., Mazo Jaciara Z., Franco Bernadette D.G.M. **Influence of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* bn in the shelf-life of refrigerated bovine meat.** Brazilian J. Microbiol. 2001; 32:42-46

FlorentinII A. Sant'anna E. Porto A. Mazo J. Franco B. **Influence of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* bn in the shelf-life of refrigerated bovine meat, Brazilian.** J. Microbiol. 2001; 32:42-46.

Fu, B. and Labuza, T.P. (1992) **Considerations for the application of time-temperature integrators in food distribution.** J. Food Distrib. Res. 23, 9-17

Fu, B. and Labuza, T.P. (1993) **Potential use of time-temperature indicators as an indicator of temperature abuse of MAP products.** In: Principles of Modified Atmosphere and SOWVIDE Product

Fu, B., Taoukis, P.S. and Labuza, T.P. (1991) **Predictive microbiology for monitoring spoilage of dairy products with time temperature integrators.** J. Food Sci. 56, 1209-1215

Gálvez.A., Abriouel.H.,López L.R.,Ben Omar N. **Bacteriocin-based strategies for food biopreservation.** Int J Food Microbiol 2007; 120: 51-70.

- García, T., Martín, R., Sanz, B., Hernández, P E. **Extensión de la vida útil de la carne fresca. I envasado en atmósfera modificada y utilización de bacterias ácido lácticas y bacteriocinas.** Rev Española Cienc Tecnol Al 1995; 35 (1): 1-18.
- Giardina, G. **Utilización de suero para el enriquecimiento de pastas alimenticias.** Facultad de Agronomía. UCV. Tesis de Grado. 102 pp. 1995.
- Gómez C., Ponce A., Freitas M., Rubio L. **Efecto de antimicrobianos naturales sobre la estabilidad físico-química, microbiológica y sensorial de hamburguesas de res mantenidas en refrigeración.** Rev Mex Cienc Pecu 2013;4(3):255-270
- Gueimonde M, Jalonen L, He F, Hiramatsu M, Salminen S. **Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacilli.** Food Research International 2006; 39 (4): 467-71.
- Guerra González Carlos René. **Efecto del suero lácteo dulce como sustituto de agua en las características de una salchicha tipo emulsión.** Tesis pre grado. Ingeniero en Agroindustria Alimentaria. Escuela Agrícola Panamericana “El Zamorano”, Honduras. 36p. 2007.
- Güne, E, and Çibik, R (2002) **Deneyisel olarak kontamine edilmiş inegöl köftelerde antimikrobiyel bir protein olan nisin L. monocytogenes üzerine inhibe edici etkisi.** In FEMS symposium on the versatility of Listeria spp. October 10-11. izmir, Turkey.
- Hampikyan H, and Ugur M (2007) **The effect of nisin on L. monocytogenes in Turkish fermented sausages (sucuks).** Meat Science76: 327-332.

Hough, G., 2010. **Sensory Shelf Life Estimation of Food Products**. Taylor & Francis, Boca Raton

HUGAS, M. **Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products** . Meat Sci 1998; 49 (1): 139-150.

Jurado G., Montalvo R., Ramírez T. y Bolivar G. **Efecto de bioconservación de carne molida de cerdo, tipo hamburguesa con *Lactobacillus acidophilus* cepa ATCC 4356 y *Staphylococcus carnosus* NRRLO2**. 2011 - alimentoshoy.acta.org.com

Kang Dong-Hyun, Koohmaraie Mohammad, and Siragusa Gregory R. **Application of Multiple Antimicrobial Interventions for Microbial Decontamination of Commercial Beef Trim**. Journal of Food Protection, Vol. 64, No. 2, 2001, Pages 168–171

Kara Recep, Yaman Hilmi, Gök Veli and Akkaya Levent. **The effect of nisin on listeria monocytogenes in chicken burgers**. Indian J. Anim. Res., 48 (2) : 171-176, 2014.

Knipe CL (2009) **Processing interventions inhibit listeria monocytogenes growth in ready to eat meat processing of ready to eat meat thermal process in of ready to eat meat products fisted**. C-Lynn knipe and Robert E. Rust. Columbus, OU. USA, Black well Publishing, 87-126.

Labuza Theodore., Fu Bin, and Taoukis Petros S. **Prediction for Shelf Life and Safety of Minimally Processed CAP/MAP Chilled Foods: A Review**. (1992). Journal of Food Protection, Vol. 55, No. 9, Pages 741-750.

- Lewus, C., Montville, T. **Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria.** J Microbiol Meth 1991; 13(2): 145-150.
- Martins, ECP y Franco, BDG de M. (1997). **Inhibición de patógenos transmitidos por los alimentos por Leuconostoc sp, productor de bacteriocina, y sake Lactobacillus aislado de salchichas frescas.** *Revista de Microbiología* , 28 (4), 284-287.
- McMeekin, T. A., Chandler, R. E., Doe, P. E., Garland, C. D., Olley, J., Putro, S., & Ratkowsky, D. A. (1987). **Model for combined effect of temperature and salt concentration/water activity on the growth rate of Staphylococcus xylosus.** The Journal of applied bacteriology, 62(6), 543–55
- Morales Castillo A. **Efecto de cloruro de potasio, SaltTrim FANV952® y suero lácteo dulce en jamón reestructurado de cerdo reducido en sodio.** Tesis Título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras. 2016.
- Moreno. Christian. **Estudio del efecto combinado de nisina y ácido láctico en la vida útil de carne de pollo.** Tesis. Universidad Técnica de Ambato.Ambato. Ecuador. 2012
- Muthukumarasamy, P. and Holley, R.A. 2007. **Survival of Escherichia coli O157:H7 in dry fermented sausages containing micro-encapsulated probiotic lactic acid bacteria.** Food Microbiology 24: 82-88.
- Niku-Paavola M.L., Laitila A., Mattila-Sandholm T., Haikara A. 1999. **New types of antimicrobial compounds produced by Lactobacillus plantarum.** Journal of Applied Microbiology 86(1): 29-35.

Ojeda J., Vásquez V. **Aplicación de ácidos orgánicos en la reducción de microorganismos Aerobios mesófilos y, Coliformes Totales y Fecales en canales de bovinos.** Revista Tecnológica ESPOL, Vol. xx, N. xx, pp-pp, 2008.

Ospina Meneses Silvia Marcela; Restrepo Molina Diego Alonso y López Vargas Jairo Humberto. **Caracterización Microbiológica y Bromatológica de Hamburguesas Bajas en Grasa con Adición de Fibra de Banano Verde Integro.** Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín 64(1): 5993-6005. 2011

Peña N., Castellano P., Perez Ibarreche M., Vignolo G. 2013. **Bacteriocins and organic acids for the control postprocessing Listeria monocytogenes contamination of frankfurters.** IV International Symposium on Lactic Acid Bacteria: Food, Health and Applications. Argentina.

Pérez Chabela M.L., Guerrero-Legarreta I., Ponce-Alquicira E. 2000. **Conservación de carnes por aplicación de bacterias lácticas.** Eds., Nuevas Tendencias en la Tecnología e Higiene de la Industria Cárnica. Universidad Miguel Hernández, Orihuela, España, pp. 119-132.

Pidcock, K., Heard, G.M. and Henriksson, A. 2002. **Application of nontraditional meat starter cultures in production of Hungarian salami.** International Journal Food Microbiology 76: 75-81.

Podolak R. K., Zayas J. F., Kastner C. L., and Fung D. Y. C. **Reduction of Bacterial Populations on Vacuum-Packaged Ground Beef Patties with Fumaric and Lactic Acids.** Journal of Food Protection, Vol. 59, No. 10, 1996, Pages 1037-1040

- Podpecan B., A. Pengov, S. Vadnjal (2007). **The source of contamination of ground meat for production of meat products with bacteria *Staphylococcus aureus***. Slovenian Veterinary Research. 44: 25-30.
- Ratkowsky, D.A. (1987) **Model for combined effect of temperature and salt concentration/water activity on the growth rate of *Staphylococcus xylosum***. J. Appl. Bacteriol. 62, 543-550
- Requena, T., Pelaez C. **Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas**. Rev Española Cienc Tecnol Al 1995; 35 (1): 19-44.
- Ruiz, A., Williams, K., Djeri N., Hinton A. and Rodrick GE (2009) **Nisin, rosemary and ethylenediaminetetraacetic acid affect the growth of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat turkey ham stored at four degrees Celsius for sixtythree days**. Poultry Science 88:1765-1772.
- Selgas D., Marin M.L., Pin C., Casas C. 1993. **Attachment of bacteria to meat surfaces: A review**. Meat Science 34: 265-273.
- Shelef L.A. 2004. **Antimicrobial effects of lactates: A review**. Journal of Food Protection 57(5): 445-450.
- Suarez H, De Francisco A, Beira L. **Influencia de bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 sobre la vida útil de filetes del híbrido de cachama *Piaractus brachypomus* x *Colossoma macropomum* empacado al vacío**. Vitae 2008; 15 (1): 32-40.
- Trujillo M, Suarez F, Gallego D. **Fermentación láctica en continuo a partir de suero dulce de leche desproteínizado**. Revista Colombiana de Biotecnología

- Urrego Velásquez, M. C, Cadavid Rojas, L. A. **Efecto sobre la calidad microbiológica, sensorial y reológica, de la aplicación de tres diferentes niveles de ácido láctico en un corte de carne de res (Huevo de Solomo).**Tesis. Universidad Nacional de Colombia., Medellín - Colombia, pp. 72. 2005
- Urribarrí Lauris, Vielma Alex , Paéz Gisela, Ferrer José, Mármol Zulay y Ramones Eduardo. **Producción de ácido láctico a partir de suero de leche, utilizando Lactobacillus helveticus en cultivo continuo.** Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XIV, N° 4, 297 - 302, 2004
- Vásquez S, Suarez H, Zapata S. **Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por Bacterias ácido Lácticas en la conservación de la carne.** Rev Chil Nutr. 2009; 36 (1): 64-71.
- Wiedemann I., Breukink E., Van Kraaij C., Kuipers O. P., Bierbaum G., De Kruijff B., Sahl H.G. 2001. **Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity.** The Journal of Biological Chemistry, 276(3):1772-1779.
- Yacoob Yousif Asraa, Hassen Muhssen Eftekhar. **The Effect of Adding Probiotics on Microbial and Organoleptic Characteristics of Beef Burger Product.** Journal of Global Pharma Technology. 2019, Vol. 11| Issue 09 (Suppl.) |152-157
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Romhouts, d.M. and Van't Riet, K. (1990) **Modeling of the bacterial growth** C&E. Appl. Environ. Microbial. 56, 1875-1881
- Zwietering, M.H., De Koos, J., Hasenack, B.E4, De Wit, J.C. and Van't Riet, K. (1991) **Modeling of bacterial growth as a function of temperature.** Appl. Environ. Microbial. 5, c, 1094-1101

## **ANEXOS**

## MATRÍZ DE CONSISTENCIA

**Título:** MODELAMIENTO DE LA BIOCONSERVACIÓN DE LA HAMBURGUESA DE CARNE ARTESANAL POR PRODUCTOS ORGÁNICOS DE BACTERIAS ACIDO LACTICAS HOMOFERMENTATIVAS PARA LA ESTIMACIÓN DE LA VIDA ÚTIL MEDIANTE EL MODELO DE ARRHENIUS.

**Autor:** Edgar Zárate Sarapura **Lugar de ejecución:** Laboratorio Ciencias Naturales Periodo 2019 – 2020

PROBLEMA	OBJETIVO	HIPOTESIS	VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADOR	ESCALA	METODOLOGIA
<p><b>General</b> ¿De qué manera se puede lograr el modelamiento de la bioconservación de las hamburguesas artesanales con aditivos orgánicos de bacterias probióticas homofermentativas?</p> <p><b>Específicos</b> ¿Cómo se puede obtener un aditivo orgánico para el modelamiento de la bioconservación de hamburguesas artesanales?</p> <p>¿Cuál es el efecto de concentración de los aditivos orgánicos en las hamburguesas artesanales?</p> <p>¿Cuáles son los parámetros cinéticos de los microorganismos mesófilos en las hamburguesas artesanales con la adición de aditivos orgánicos?</p> <p>¿Cómo aplicar los parámetros cinéticos de crecimiento en la determinación de la vida útil?</p>	<p><b>General</b> Determinar el modelamiento de la bioconservación de hamburguesas artesanales con aditivos orgánicos de bacterias probióticas homofermentativas.</p> <p><b>Específicos</b> Obtener aditivos orgánicos de bacterias probióticas homofermentativas para el modelamiento y bioconservación de las hamburguesas artesanales.</p> <p>Determinación del efecto de concentración de los aditivos orgánicos en las hamburguesas artesanales para el modelamiento y su bioconservación.</p> <p>Determinación de parámetros cinéticos de microorganismos mesófilos en las hamburguesas artesanales con la adición de aditivos.</p> <p>Aplicar parámetros cinéticos de crecimiento en la determinación de la vida útil.</p>	<p><b>General</b> La determinación del aditivo orgánico óptimo permitirá el modelamiento de la bioconservación de hamburguesas artesanales.</p> <p><b>Específicos</b> La obtención de aditivos orgánicos de bacterias probióticas homofermentativas permitirá adicionar a las hamburguesas artesanales.</p> <p>Se logrará determinar el efecto de la concentración al adicionar los aditivos orgánicos de bacterias probióticas homofermentativas en las hamburguesas artesanales.</p> <p>La determinación de parámetros cinéticos permitirá elegir el mejor aditivo orgánico de bacterias probióticas homofermentativas.</p> <p>Los parámetros cinéticos de microorganismos mesófilos permitirán determinar la vida útil.</p>	<p><b>Dependientes</b> Bioconservación de hamburguesas artesanales</p> <p><b>Independientes</b>  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Población de Bacterias probióticas homofermentativas</li> <li>• Extracto crudo</li> <li>• Nisina</li> </ul> </p> <p>Efecto de la adición de aditivos orgánicos de bacterias probióticas homofermentativas. Parámetros cinéticos de microorganismos mesófilos. Parámetros cinéticos de microorganismos mesófilos a diferentes temperaturas.</p>	<p><b>Dependientes</b> Tiempo de Bioconservación Temperatura de bioconservación</p> <p><b>Independientes</b> Crecimiento bacteriano Ácido láctico Aditivo Biomasa Aditivo Aditivo</p> <p>Velocidad de crecimiento. Fase de adaptación. Velocidad de crecimiento.</p>	<p><b>Dependientes</b> Número de días Temperatura</p> <p><b>Independientes</b> UFC/gr mg/L ppm Nisina</p> <p>UFC/gr % Ácido Láctico ppm Nisina</p> <p>Log UFC/Hora</p> <p>Horas Log UFC/Hora</p>	<p>Cuantitativa</p>	<p>Ecuación de Arrhenius.</p> <p>Recuento en placa</p> <p>Recuento en placa</p> <p>Recuento en placa</p> <p>Titulación Gravimetría</p> <p>Recuento en placa Gravimetría Gravimetría Ecuación Baranyi y Roberts</p>