

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA (UdelaR)  
FACULTAD DE CIENCIAS

LICENCIATURA EN BIOQUIMICA  
(PLAN 2003)

TESIS DE LICENCIATURA



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

## **“ESTUDIO DE LA MICROFLORA BACTERIANA Y CAMBIOS FÍSICOQUÍMICOS EN CARNE BOVINA ENVASADA AL VACÍO Y ALMACENADA EN FRÍO”**

AUTOR: Jéssica Pamela Mateauda Nova

TUTORA: Stella Reginensi Ph.D.

CO-TUTOR: Jorge Bermúdez MSc.

LABORATORIO: Unidad Tecnológica de Alimentos – Facultad de Agronomía (UdelaR).

Fecha: 26/04/2013



FACULTAD DE  
**AGRONOMIA**  
UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**

UDELAR | [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiere agradecerle a la empresa Frigorífico San Jacinto – NIREA S.A. por haberme apoyado en la realización de éste proyecto, sobre todo a Paula Tucci y al Ing. Juan José Brum, por haber creído en mi propuesta y haberla transmitido a sus superiores quienes también confiaron en la misma.

Por otro lado, agradezco a mi Tutora Stella Reginensi y a mi Co-tutor Jorge Bermudez, por su apoyo, por los conocimientos brindados y por su paciencia.

Agradezco, además al personal de Control de Calidad del Frigorífico San Jacinto – NIREA S.A, en especial a Jorge Rebufello, Alvaro César, Edgar Colman, Andrea Seirrotti y Paola Souto quienes me brindaron su apoyo en el desarrollo del estudio. A Margarita Andrada, Martha Rossetto, Natalia Borges y Valeria de la Peña, por el apoyo incondicional y por el espacio que me dieron para trabajar durante el desarrollo del proyecto.

Quiero agradecerle especialmente a mis padres Sergio y Rosario, quienes siempre confiaron en mí y me apoyaron en todos los ámbitos de la vida. A Franco y Estefanía, mis hermanos, por formar parte de mi vida y apoyarme en todo. A Matías, por haberme apoyado durante mis estudios. A mis grandes amigas, por su apoyo y aliento, a mi tío Hector, mi Tía Janet y sus respectivas familias quienes compartieron parte de mi carrera, a mi tía Rita por sus sabios consejos y a mi abuela Luisa que estuvo siempre pendiente de mí.

## INDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	1
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
2.1 Características generales de la carne .....	3
2.2 Ciencia de la carne: Transformación del músculo en carne .....	4
2.2.1 Desangrado .....	4
2.2.1.1 Consecuencias generales del fallo circulatorio .....	4
2.2.2 Rigor Mortis .....	5
2.2.3 Cambios del aspecto físico del músculo .....	6
2.3 Propiedades fisicoquímicas de la carne .....	7
2.3.1 pH de la carne .....	7
2.3.1.1 Efecto del estrés del animal en el pH de la carne .....	7
2.3.1.2 Carnes pálidas y oscuras .....	8
2.3.2 Color de la carne .....	9
2.3.3 Capacidad de retención de agua .....	10
2.4 Microbiología de la carne .....	11
2.4.1 Factores extrínsecos que influyen en la actividad microbiana .....	14
2.4.1.1 Temperatura .....	14
2.4.1.2 Humedad relativa .....	15
2.4.1.3 Disponibilidad de oxígeno .....	16
2.4.2 Alteración de la carne en aerobiosis .....	16
2.4.3 Alteración de la carne en anaerobiosis .....	18
2.4.3.1 <i>Brochothrix thermosphacta</i> .....	18
2.4.3.2 Bacterias ácido lácticas .....	19
2.5 Vida útil de cortes envasados al vacío .....	21
2.5.1 Conservación de la carne mediante envasado al vacío .....	23
2.5.2 Alteraciones de la carne mediante envasado al vacío .....	25
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	27
3.1 Objetivo general .....	27

3.2	Objetivos específicos.....	27
<b>4.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
4.1	Preparación y esquema de muestreos.....	28
4.2	Recuento microbiológico .....	28
4.3	Medición de pH.....	30
4.4	Determinación del porcentaje de humedad.....	30
4.5	Medición de color .....	30
4.6	Identificación de aislamientos y caracterización genotípica.....	31
4.6.1	Caracterización genotípica .....	31
4.6.2	Secuenciación del gen 16S rRNA .....	32
4.7	Estadística .....	32
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>33</b>
5.1	Aislamientos y recuentos de diferentes grupos bacterianos.....	33
5.2	Caracterización genotípica de diferentes grupos bacterianos .....	37
5.3	Evaluación fisicoquímica de las muestras de carne durante las diferentes etapas de almacenamiento a 0°C. ....	41
5.3.1	Evaluación del pH y Humedad .....	41
5.3.2	Evaluación del color .....	43
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>46</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>48</b>

## 1. RESUMEN

En el presente estudio se evaluó el desarrollo microbiológico y los cambios fisicoquímico en cortes de bife angosto (*Longissimus dorsi*) envasados al vacío y almacenados durante 142 días a  $0\pm 1^{\circ}\text{C}$  en cámara frigorífica. Para su evaluación microbiológica se cuantificaron y caracterizaron genotípicamente microorganismos mesófilos aerobios, psicrótrofos, bacterias ácido lácticas, coliformes totales y *Brochothrix thermosphacta*, como también la presencia de patógenos como *Salmonella sp.* y *E.coli* O157:H7 en las distintas etapas de muestreo, que fueron al día 0, a los 14 días, a los 91 días y a los 142 días de almacenamiento. Para el caso de la evaluación fisicoquímica, se realizaron mediciones de pH, porcentaje de humedad y color (parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ) en las mismas instancias de muestreo que para la evaluación microbiológica.

Los resultados microbiológicos mostraron un desarrollo gradual de todos los grupos bacterianos en el período de almacenamiento obteniéndose al final del estudio resultados por encima de especificaciones microbiológicas, además se obtuvo la ausencia de *Salmonella sp.* y *E.coli* O157:H7 en todo el período antes mencionado. Para las bacterias ácido lácticas, a los 142 días de almacenamiento, no sólo se obtuvo el mayor recuento ( $7,27 \pm 0,23 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ ), sino que también las especies predominantes en ese momento, como *Carnobacterium divergens* y *Lactobacillus curvatus*. Por otro lado, en todas las etapas de almacenamiento se aisló e identificó *B. thermosphacta*, no reportada en Uruguay, lo que pudo estar asociado a un valor inicial de pH elevado. El pH inicial de la carne fue de  $6,25 \pm 0,17$  y disminuyó a  $5,83 \pm 0,10$  a los 142 días de almacenamiento, lo cual fue concordante con el crecimiento de bacterias ácido lácticas y la disminución del porcentaje de humedad en las muestras. La variación de color fue evaluada con el parámetro  $L^*$  y el índice de tono  $H^*$  (relación entre  $a^*$  y  $b^*$ ), el parámetro  $L^*$  aumentó significativamente en todo el período ( $P < 0,01$ ) mientras que el índice de tono  $H^*$  disminuyó significativamente ( $P < 0,01$ ) al día 91 de almacenamiento. Considerando tanto el límite

microbiológico de alteración de la carne, como la aceptabilidad sensorial, se pudo establecer para la carne bovina envasada al vacío y almacenada a  $0\pm 1^{\circ}\text{C}$ , un tiempo de vida útil de hasta 90 días.

## **2. INTRODUCCIÓN**

La carne, es uno de los alimentos que posee alta actividad de agua y alto contenido de nutrientes disponibles en la superficie, los cuales pueden ser utilizados por microorganismos que producen deterioro. El deterioro, puede ser definido como cualquier cambio en el alimento que lo hace inaceptable al consumidor desde un punto de vista sensorial (ERCOLINI *et al.*, 2006).

El proceso de deterioro de la carne y por ende los cambios en el perfil microbiológico, depende de factores intrínsecos y extrínsecos de la misma, como puede ser el pH, la morfología de su superficie, la disponibilidad de O<sub>2</sub>, la presencia y el desarrollo de bacterias, la temperatura (ERCOLINI *et al.*, 2009), como también el grado de contaminación de la carne durante diferentes etapas del proceso de producción, como en el sacrificio, desosado, procesado, almacenamiento y distribución. Sin embargo, la contaminación microbiana es la mayor preocupación y es el factor más importante en el proceso de deterioro. (HERNÁNDEZ-MACEDO *et al.*, 2011).

Por lo anterior, se han implementado distintas alternativas para la extensión de la vida útil de cortes cárnicos como es el envasado al vacío. La técnica de envasado de carne al vacío, ha significado un avance importante en la conservación de éste producto por un período prolongado sin que sea necesaria su congelación (SCHÖBITZ *et al.*, 1990).

### **2.1 Características generales de la carne**

La carne está compuesta por un 70,4% de agua, 20,8% de proteínas, 7,2 % de grasa y 1,2 % de sales minerales. La importancia de las proteínas se asocia a su función como materia constitutiva de los tejidos blandos del organismo, pero al mismo tiempo pueden ser utilizadas como fuente de energía. Dentro de las proteínas del músculo se encuentran las proteínas miofibrilares, siendo la actina y la miosina las principales, su combinación da lugar a la formación de

actomiosina contráctil del músculo activo o en pre-rigor y la actomiosina inextensible del músculo en *rigor mortis*. Las grasas desempeñan una función importante en la nutrición ya que son utilizadas como fuente de energía, son portadoras de vitaminas liposolubles y aportan ácidos grasos esenciales. Las sustancias minerales participan de múltiples maneras en los procesos fisiológicos del organismo, actuando como catalizadores en varios procesos biológicos y ejerciendo una acción promotora de la actividad de muchas enzimas (FRITZ y ANTILA, 1993); (LAWRIE, 1977) y (SENER y SCHERZ, 1999).

El consumo de carne y productos cárnicos contribuye fundamentalmente a la provisión de proteína, hierro, zinc, vitamina A y vitamina B. También contribuye a la incorporación frecuentemente demasiado elevada, de grasa, sodio, purinas y colesterol. Sin embargo, las cantidades de sodio, purinas y colesterol en la carne y productos cárnicos no presentan ningún riesgo adicional para la salud de las personas con un metabolismo sano y peso normal (SEUB, 1991).

## **2.2 Ciencia de la carne: Transformación del músculo en carne**

### **2.2.1 Desangrado**

El desangrado (degüello o sangría) del animal, marca el comienzo de cambios post-mortem del músculo. Tan pronto como desciende la presión sanguínea, el sistema circulatorio ajusta su funcionamiento en un intento de mantener un aporte sanguíneo adecuado para los órganos vitales, por lo tanto el bombeo cardíaco aumentará y los vasos periféricos se contraerán intentando mantener la presión sanguínea de los órganos vitales (FORREST *et al.*, 1975).

#### **2.2.1.1 Consecuencias generales del fallo circulatorio**

En el proceso de muerte del animal se detiene la circulación sanguínea, se inicia una serie compleja de cambios en el tejido muscular. Los diversos tejidos continúan su actividad metabólica bajo control local. El músculo consume energía para mantener la temperatura y la integridad estructural de sus células

frente a la tendencia espontánea a la degradación. El cambio más inmediato después del desangrado del animal es el fallo en el transporte de oxígeno por la sangre al músculo, con la consiguiente caída del potencial de oxidación. A consecuencia de éste cambio el sistema enzimático citocromo es incapaz de actuar, siendo imposible la síntesis de ATP por éste mecanismo. El nivel de ATP se mantiene constante durante cierto tiempo por resíntesis a partir de ADP y del fosfato de creatina. Una vez agotada la reserva de fosfato de creatina, el nivel total disminuye progresivamente. Por otro lado, debido a la constante actividad ATPasa sarcoplásmica desciende el nivel del ATP, produciéndose simultáneamente fosfato inorgánico que estimula la degradación de glucógeno a ácido láctico. La resíntesis de ATP por glucólisis anaeróbica es incapaz de mantener el nivel de ATP debido a que es un proceso poco eficaz. La escasez de ATP aumenta la dificultad de mantener la integridad estructural de las proteínas. El descenso del pH causado por la producción de ácido láctico hace que las proteínas sean más susceptibles a la desnaturalización, que se manifiesta por una reducción en la capacidad de retención de agua, y que las proteínas miofibrilares se aproximen a su punto isoeléctrico. Ambas circunstancias determinan la exudación del músculo. La desnaturalización de las proteínas sarcoplásmicas también contribuye a aumentar su susceptibilidad al ataque por las proteasas de las catepsinas del músculo, que *in vivo* permanecen inactivas dentro de los lisosomas. La degradación de las proteínas a péptidos y aminoácidos y la acumulación de los diversos metabolitos del proceso glucolítico, convierten al músculo en un rico medio de cultivo para las bacterias (LAWRIE, 1977).

### **2.2.2 Rigor Mortis**

Uno de los cambios post-mortem más llamativos, que ocurren durante la conversión del músculo en carne, es la rigidez de los músculos después de la muerte, lo que se denomina *rigor mortis*. La rigidez observada en el *rigor mortis*

se debe a la formación de enlaces cruzados permanentes entre los filamentos de actina y miosina del músculo (FORREST et al., 1975).

Como consecuencia del fallo circulatorio, no sólo ocurre un rápido agotamiento del ATP, sino que también falla el sistema regulador que controla la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ . La elevada concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  que se genera en el sarcoplasma induce la contracción de las fibras musculares y el consumo de ATP. Como no queda ATP para disociar el complejo actina-miosina, el músculo pierde su extensibilidad natural (WONG, 1995).

La pérdida de extensibilidad debida a la formación de actomiosina transcurre lentamente al principio (período de demora); luego con más rapidez (fase rápida) y, finalmente, la extensibilidad permanece constante a un nivel bajo. Lógicamente, el descenso del nivel de ATP y por ende la aparición de la fase rápida de instauración del *rigor mortis*, será tanto más rápido cuanto menor sea la reserva de glucógeno, pero incluso, con abundante glucógeno, la resíntesis de ATP por glucólisis no es capaz de mantener un nivel suficientemente alto para evitar la formación de actomiosina (LAWRIE, 1977).

### **2.2.3 Cambios del aspecto físico del músculo**

Después del sacrificio, cuando se ha consumido el oxígeno, los músculos tienen un color púrpura oscuro. Cuando la carne fresca se corta por primera la superficie del corte puede presentar este color rojo oscuro; tras su exposición a la atmósfera durante algunos minutos se oxigena la mioglobina y la carne cambia a un color rojo más brillante. A medida que los músculos alcanzan el *rigor mortis* se convierten en muy firmes y rígidos. El agua retenida en el músculo durante la conversión del mismo en carne, contribuye a la jugosidad y palatabilidad de la carne (FORREST et al., 1975).

## **2.3 Propiedades fisicoquímicas de la carne**

### **2.3.1 pH de la carne**

El pH final de la carne puede variar entre 5,5 a 7,0, el valor depende en gran medida del contenido de glucógeno presente en el músculo en el momento de la faena. Luego de que el animal muere, el glucógeno es convertido en ácido láctico vía glucólisis, y si las reservas son elevadas, una concentración de alrededor del 0,9% es alcanzada con una disminución del pH. Si las reservas de glucógeno son consumidas antes de la faena, la concentración final de ácido láctico puede ser menos de la mitad del valor normal, con un valor de pH que puede ser mayor a 6,0 (GILL y NEWTON, 1982).

#### **2.3.1.1 Efecto del estrés del animal en el pH de la carne**

El agotamiento del glucógeno muscular es atribuido a situaciones de estrés. Los animales que son transportados al matadero sufren especialmente trauma y miedos durante la carga, descarga y transporte, y son estresados además por las luchas de jerarquía entre ellos. Bajo estas condiciones las reservas de glucógeno que se han visto reducidas tardan un cierto tiempo hasta volver a regenerarse (PALEARI *et al.*, 1995).

El estrés físico y la falta de alimento pueden tener importantes efectos sobre la calidad de la carne. El estrés ante-mortem provoca consumo excesivo de glucógeno muscular, minimizando la cantidad de ácido láctico en el músculo post-mortem e impidiendo con ello la caída natural del pH en este periodo (GALLO, 1997).

Según HOFMANN (1988), el pH tiene una influencia directa o indirecta sobre: el color, la ternura, el sabor, la capacidad de fijación de agua y la conservabilidad de la carne.

### **2.3.1.2 Carnes pálidas y oscuras**

Existen dos alteraciones principales de la calidad de la carne producidas por estrés: las carnes DFD (dark =oscura, firm =consistente, dry = seca) y las carnes PSE (pale =pálida, soft= blanda, exudative = acuosa), éstas últimas se han descrito únicamente en el ganado porcino (MANTECA, 2004).

El origen de la carne tanto PSE como DFD, es atribuido a la misma causa genética que se asocia a su elevada susceptibilidad al estrés, debido a un aumento en la secreción de adrenalina (WIRTH, 1987).

En general los animales sensibles al estrés presentan temperaturas anormalmente altas, glucólisis rápida (caída del pH) y una veloz instauración del *rigor mortis*. En los animales susceptibles al estrés los músculos son generalmente PSE (FORREST *et al.*, 1975).

Debido al brusco descenso de pH en un momento en que la carne aún presenta elevada temperatura, se produce una desnaturalización proteica que afecta la fijación de agua, por lo cual la carne PSE presenta sobre todo una mala fijación del agua. Además el color de la carne PSE es marcadamente claro (WIRTH, 1987).

Los animales resistentes al estrés mantienen normal su temperatura y sus condiciones homeostáticas musculares a pesar de la acción estresante de agentes relativamente graves. Sin embargo, esto lo realizan a expensas de sus reservas musculares de glucógeno. En éstos animales la deficiencia de glucógeno muscular origina una lenta y limitada glucólisis después de la muerte. Los tejidos de este tipo son DPD (FORREST *et al.*, 1975) y son caracterizados por alcanzar un pH final elevado, superior a 6 (POTTHAST, 1976).

La carne DFD es deficiente en glucosa, por lo que los aminoácidos son atacados rápidamente y el deterioro se hace evidente en densidades de células bacterianas más bajas de lo normal (NEWTON *et al.*, 1978).

Esta carne almacenada y envasada al vacío, o en atmósfera modificada se deteriora rápidamente, resultando una coloración verde la cual se debe a la producción de sulfuro de hidrógeno a partir de cisteína o glutatión por *Shewanella putrefaciens*, reaccionando con la mioglobina en el tejido muscular para formar sulfomioglobina, un pigmento de color verde (DOYLE *et al.*, 1997).

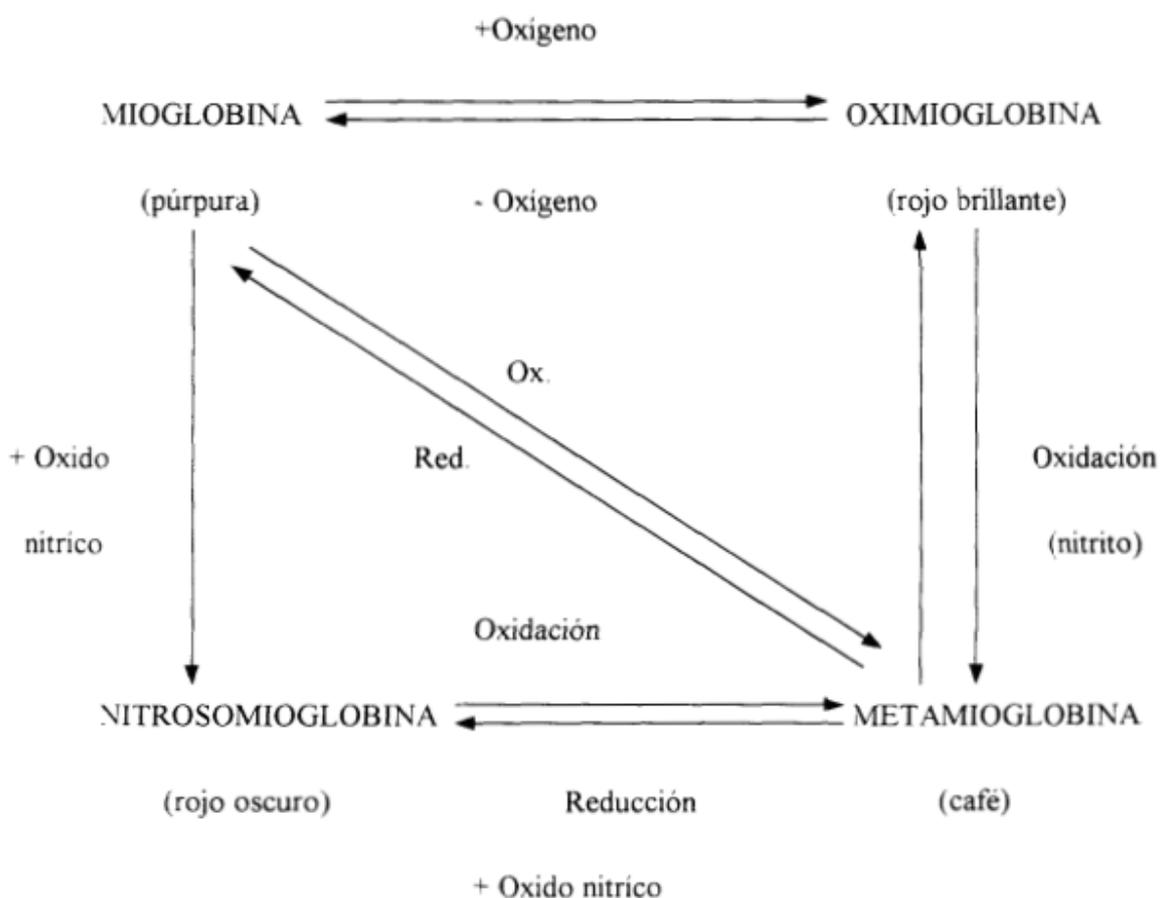
### **2.3.2 Color de la carne**

La primera y más importante impresión que tienen los consumidores de los productos cárnicos es el color. El color de la carne fresca está determinado por la proporción y distribución de la mioglobina, pigmento proteínico que proporciona el color rojo característico (SEIDEMAN *et al.*, 1984).

La mioglobina es el pigmento principal del músculo esquelético, aunque también se encuentran cantidades importantes de hemoglobina y otros pigmentos como la catalasa y enzimas citocromo, siendo menor su contribución al color (FORREST *et al.*, 1975).

La mioglobina está formada por una porción proteica denominada globina y una porción no proteica, el grupo hemo que contiene en su parte central una molécula de hierro de suma importancia debido a que de su estado de oxidación dependerá la coloración final adquirida por la carne. Cuando el hierro está oxidado (estado férrico) no puede combinarse con otras moléculas, incluyendo el oxígeno. Si se encuentran en estado reducido (estado ferroso) se combina fácilmente con el agua o con el oxígeno. El color deseable en carne se debe a que es más conveniente tener la molécula de hierro en su estado reducido para que interaccione con el oxígeno y produzca la coloración rojo intenso deseable en la carne (FORREST *et al.*, 1975).

Este pigmento oxigenado se denomina oximioglobina. En carne empacada al vacío, donde existen cantidades pequeñas de oxígeno, el hierro del pigmento se oxida, cambiando a un color marrón. Esta forma del pigmento se denomina metamioglobina (Figura 1). El color puede representar un problema debido a que los consumidores asocian un cambio de color con un período largo de almacenamiento, a pesar de que el color puede cambiar en un período de tiempo corto.



**Figura 1.** Pigmentos en carne cruda

### 2.3.3 Capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua (CRA) se define como la capacidad que tiene la carne para retener agua cuando es sometida a fuerzas externas.

Esta característica se desea conservar en carne que es sometida a fermentación láctica ya que está relacionada con la jugosidad. Uno de los problemas que se ha presentado con esta propiedad es su dependencia del pH, en la medida que éste se reduce se genera un exudado excesivo en la carne, que va en detrimento de su calidad (ADAMS y HALL, 1988). Además de la jugosidad, otras propiedades de la carne como el color y la textura, dependen en cierta medida de la CRA. A nivel químico, la pérdida de la CRA se debe a la reducción de pH de la superficie de la carne por la producción de ácido láctico lo que hace que este se aproxime a los valores del punto isoeléctrico de las proteínas, donde la carga neta es cero y por lo tanto no se puede retener agua mediante enlaces electrostáticos. También influye en la pérdida de la CRA el efecto estérico debido a la asociación de las proteínas por la rigidez cadavérica que provoca la ausencia de espacio dentro de la red de proteínas donde se pueda retener agua (LAWRIE, 1977).

## **2.4 Microbiología de la carne**

Debido al alto contenido de agua y la abundancia de importantes nutrientes disponibles en la superficie, la carne es reconocida como uno de los alimentos más perecederos. Aparte de daños físicos, oxidación, y cambios de color, otro síntoma de deterioro es el crecimiento indeseado de microorganismos a un nivel inaceptable. En éste caso el deterioro bacteriano lleva al desarrollo de olores desagradables y frecuentemente a la formación de limo, que hacen al producto indeseable para el consumo humano (ERCOLINI *et al.*, 2006). El desarrollo del deterioro organoléptico está relacionado con el consumo microbiano de nutrientes de la carne, como azúcares y aminoácidos libres, y la liberación de metabolitos volátiles indeseables (ERCOLINI *et al.*, 2009).

La microflora bacteriana habitual de la carne fresca es muy heterogénea; está formada principalmente por *Pseudomonas*, géneros de la familia

*Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter*, *Brochotrix thermosphacta* y *Lactobacillus*, que dependiendo de su número y especie pueden causar numerosas alteraciones y en algunos casos intoxicaciones. Dentro de las bacterias patógenas se pueden encontrar *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* enteropatógeno, *Clostridium perfringens* y ocasionalmente *Clostridium botulinium* (CARDENAS y GIANNUZZI, 2005).

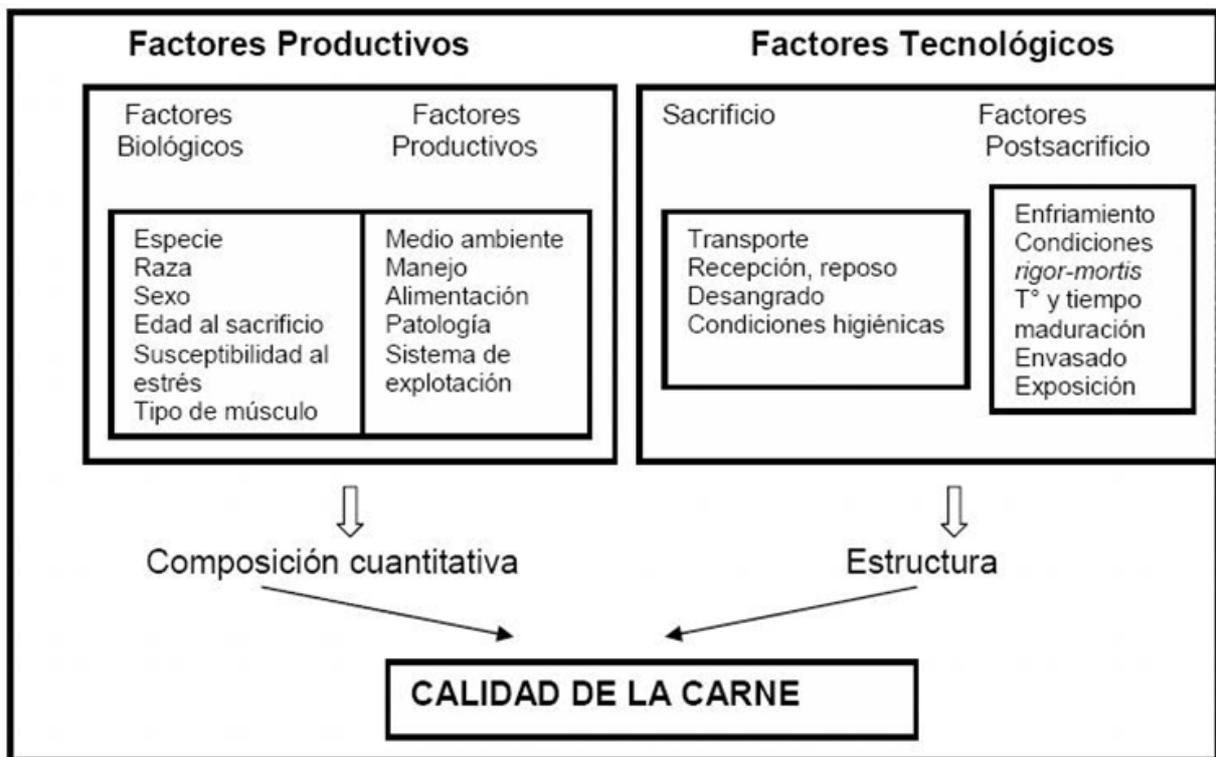
Cada microorganismo tiene una temperatura de crecimiento óptima así como una mínima y una máxima; en consecuencia, la temperatura a que se almacena la carne influencia marcadamente el tipo, la velocidad y extensión de la actividad microbiana. Con sólo modificar algunos grados la temperatura de almacenamiento se puede favorecer el desarrollo de algunos microorganismos distintos y dar lugar a un tipo de alteración diferente (FORREST *et al.*, 1975).

La alteración de la carne puede variar de acuerdo a la contaminación microbiana de la misma y de acuerdo a las condiciones en que la carne es almacenada (ERCOLINI *et al.*, 2006); es un fenómeno que ocurre principalmente en la superficie, siendo estéril el interior del músculo del animal sano, al momento de su faena (SCHÖBITZ *et al.*, 1990)

La contaminación microbiana proviene de varias fuentes, por ejemplo la contaminación inicial de la carne ocurre durante el desangrado, dado al uso de equipamiento no estéril lo que introduce microorganismos en el sistema vascular. Subsecuente contaminación ocurre en varias etapas que incluyen el faenado, cortado, procesado, almacenamiento y distribución de la carne. Fuentes de contaminación pueden incluir el agua, instalaciones, equipamiento y personal de manipulación. Materia fecal, que contiene microorganismos de deterioro y patógenos, también puede servir como fuente de microorganismos (HERNÁNDEZ-MACEDO *et al.*, 2011). Factores extrínsecos tales como temperatura, humedad relativa, presencia o ausencia de oxígeno y estado físico

de la carne, pueden influir sobre la actividad microbiana. También deben citarse sus propiedades intrínsecas, tales como contenido de humedad, pH, potencial de óxido reducción, valor nutritivo y presencia o ausencia de barreras o sustancias inhibidoras. Sin embargo, los factores que ejercen la máxima influencia en el crecimiento de microorganismos de la carne y productos cárnicos son la temperatura de almacenamiento, la humedad y la disponibilidad de oxígeno (FORREST *et al.*, 1975).

A continuación, en el Figura 2, se detalla a forma de resumen, los factores que afectan la calidad de la carne.



**Figura 2.** Factores que influyen en la calidad de la carne.

Fuente: BUXADÉ (1998)

## **2.4.1 Factores extrínsecos que influyen en la actividad microbiana**

### **2.4.1.1 Temperatura**

La refrigeración constituye el proceso tecnológico más generalizado para retardar la alteración de la carne (JAY, 1996); por lo tanto, los microorganismos capaces de desarrollarse a bajas temperaturas serán los responsables principales de la alteración de la misma.

La carne fresca puede mantenerse tanto congelada como enfriada. Se considera enfriada cuando la temperatura que le sigue al proceso *post mortem* es mantenida entre -1,5 a +7°C. La temperatura óptima de mantenimiento y transporte para la carne enfriada debe ser la menor posible a la cual no ocurra el congelamiento (HERNÁNDEZ-MACEDO *et al.*, 2011).

El desarrollo de bacterias a temperaturas de enfriamiento se considera como psicrófila. Ellas pertenecen tanto al género de Gram-positivas, como son las bacterias ácido lácticas, como al de Gram-negativas, como *Pseudomonas* ssp. y *Enterobacteriaceae*. Las especies de *Pseudomonas* están particularmente involucradas en el deterioro de la carne a temperaturas de refrigeración (ERCOLINI *et al.*, 2009). En estas condiciones, el crecimiento de bacterias aeróbicas Gram-negativas es inhibido, y las bacterias ácido lácticas se transforman en el componente dominante de la flora microbiana durante el almacenamiento de la carne a 0°C. Estas bacterias no necesitan oxígeno para su crecimiento y toleran valores de pH más bajos que las bacterias Gram-negativas comúnmente encontradas en carne, especialmente bajo condiciones anaeróbicas (EGAN, 1983).

Por lo tanto, las temperaturas de refrigeración y enfriamiento tienen una importante acción selectiva sobre la flora mixta formada por microorganismos mesófilos y psicrófilos y pueden afectar la composición de la carga inicial de la carne, conduciendo a modificaciones durante el almacenamiento. Existen dos razones

importantes por las cuales las temperaturas de refrigeración reducen el crecimiento de las bacterias psicrótrofas sobre la superficie de la carne: la extensión de la fase de latencia y la reducción de la velocidad de crecimiento (CARDENAS y GIANNUZZI, 2005).

El buen resultado del almacenamiento bajo refrigeración de la carne fresca depende de tres puntos, que son conocidos como la **Ley de Monvoisin** (ROSSET, 1982), la cual señala:

- 1- La contaminación inicial debe ser baja, ya que los microorganismos no son eliminados por la refrigeración, éstos sólo disminuyen o se inhibe su crecimiento.
- 2- Es importante enfriar el producto tan rápido o tempranamente como sea posible, para prevenir el crecimiento de bacterias mesófilas, organismos degradadores o patógenos.
- 3- La cadena de frío no debe ser interrumpida, sin embargo debe recordarse que una cadena efectiva de frío no inhibe totalmente el crecimiento de las bacterias psicrótroficas y psicrófilas. La sanidad microbiológica del producto depende si ha sido constantemente mantenido a temperaturas bajas ya que cualquier periodo mayor a 4°C puede permitir el crecimiento de especies mesófilas, especialmente patógenas.

#### **2.4.1.2 Humedad relativa**

La humedad relativa necesaria para mantener las condiciones óptimas de almacenamiento varía con la temperatura; en general, cuanto más altas son las corrientes de refrigeración de la carne (-1°C a 3°C), la humedad relativa debe oscilar aproximadamente entre 88-92%. Si la humedad relativa es demasiado alta, en la superficie de la carne se condensa la humedad (suda); si es demasiado baja se perderá en la atmósfera (en primer lugar a partir de la superficie). Si ocurre la sudoración, las superficies se humedecen y se convierten en muy aptas para el desarrollo microbiano y la alternación cárnica. De otra

parte, el desarrollo microbiano es inhibido por la deshidratación y oscurecimiento consiguiente de las superficies cárnicas, lo que da por resultado pérdidas económicas debido a mermas y falta de atracción visual (FORREST *et al.*, 1975).

#### **2.4.1.3 Disponibilidad de oxígeno**

La disponibilidad de oxígeno es importante porque determina el tipo de microorganismo que se desarrollará; algunos son absolutamente dependientes del oxígeno; otros crecen en ausencia total de este, y existen otros que crecen en presencia o ausencia de oxígeno. En la carne almacenada en atmósfera normal (aire), predominan las condiciones aeróbicas, pero solamente en o muy cerca de la superficie, debido a que es muy difícil la difusión del oxígeno en los tejidos; por lo tanto, el crecimiento microbiano que tiene lugar en la superficie de la carne es, en gran parte, el de los aerobios estrictos y facultativos; mientras que las porciones internas de la carne contienen fundamentalmente bacterias anaerobias y facultativas. El empleo de ciertos envases reduce o previene completamente la actividad de los microorganismos aerobios (FORREST *et al.*, 1975).

En un ambiente aerobio, prevalecen bacterias del género *Pseudomonas*, seguido de *Acinetobacter*, *Moraxella* y *Flavobacterium*. En carne almacenada en condiciones anaeróbicas, prevalecerá la flora Gram-positiva, especialmente bacterias ácido lácticas y *Brochothrix thermosphacta* (SCHÖBITZ *et al.*, 1990).

#### **2.4.2 Alteración de la carne en aerobiosis**

Cuando las bacterias utilizan como fuente principal de carbono los carbohidratos, no se producen, por lo general, productos metabólicos especialmente desagradables a nuestros sentidos del olfato y gusto (MOSSEL e INGRAM, 1955). Sin embargo, la utilización de aminoácidos u otros compuestos que contienen nitrógeno y/o azufre, producen a menudo metabolitos indicadores del deterioro (McMEEKIN, 1982). Por lo tanto, la aparición de signos de alteración

depende tanto del sustrato como de la actividad metabólica bacteriana. Las *Pseudomonas* y las bacterias del grupo *Moraxella/Acinetobacter* son, habitualmente, los microorganismos aerobios presentes en la microbiota de la carne.

En las primeras fases, las *Pseudomonas* tienen un metabolismo glucolítico y por lo tanto no producen metabolitos especialmente desagradables, pero cuando la densidad bacteriana supera los  $10^8$  UFC/cm<sup>2</sup> (GILL, 1983), la glucosa “superficial” se ha consumido completamente y la difusión de la misma desde el interior del músculo resulta insuficiente, por lo que comienzan a utilizar el lactato y los aminoácidos generando a partir de estas sustancias de putrefacción como ácidos, ésteres, sulfuros y aminos (GILL, 1986; GREER, 1989). Entonces, el pH de la carne aumenta como consecuencia de la liberación de amoníaco, produciéndose por ello un incremento en la capacidad de retención de agua de las proteínas, lo que las hace más susceptibles al ataque de las proteinasas bacterianas (KRAFT, 1992).

En menor cantidad, también se producen otros metabolitos como aminos biogénicos (cadaverina, putrescina, isobutilamina), sulfuro de hidrógeno y metil sulfuro, que, aún en pequeñas concentraciones, algunos de ellos (aminos volátiles y sulfuros), confieren a la carne olores y sabores marcadamente desagradables (ESKIN *et al.*, 1971; MILLER *et al.*, 1973). En esta fase, la densidad bacteriana es elevada y ocurre la acumulación de catabolitos rápidamente (GILL, 1983).

En las carnes DFD, las *Pseudomonas*, además de *Shewanella putrefaciens*, son igualmente los microorganismos que determinan su alteración. El pH de estas carnes es mayor que el de las carnes normales y no influye negativamente en el desarrollo de las *Pseudomonas* (GILL y NEWTON, 1982). Sin embargo, la glucosa puede estar ausente desde las primeras fases del desarrollo bacteriano y los microorganismos tendrán que recurrir a los aminoácidos directamente. En

estas condiciones, la alteración resulta evidente con concentraciones microbianas de  $10^6$  UFC/cm<sup>2</sup> (GILL, 1983).

### **2.4.3 Alteración de la carne en anaerobiosis**

Los lactobacilos y *Brochothrix thermosphacta* son los microorganismos que juegan un papel más importante en la alteración de la carne en anaerobiosis en fases tardías de almacenamiento en frío. Si la microbiota dominante está compuesta por lactobacilos, la fermentación de la glucosa produce gran cantidad de ácido láctico y el descenso de pH impide el crecimiento de *B. thermosphacta*. En estas condiciones, la alteración de la carne se detecta sobre todo como consecuencia de la acumulación de ácidos grasos de cadena corta (SUTHERLAND *et al.*, 1976). Esta alteración se produce de forma lenta y sólo se detecta mucho después de haberse alcanzado la fase estacionaria microbiana (NEWTON *et al.*, 1977; SUTHERLAND *et al.*, 1975).

En carnes con valores de pH 6,0 o superiores, *Shewanella putrefaciens*, tiene un papel importante en su alteración, ya que en condiciones anaeróbicas con concentraciones de  $10^6$  UFC/cm<sup>2</sup> se producen grandes cantidades de sulfuro de hidrógeno y, por tanto, de sulfomióglobina, lo que provoca un evidente enverdecimiento de la carne (NICOL *et al.*, 1970; GILL y NEWTON, 1979).

#### **2.4.3.1 *Brochothrix thermosphacta***

Es un bacilo Gram-positivo, pleomórfico, no pigmentado, catalasa positivo, inmóvil, aerobio y anaerobio facultativo que no forma cápsulas ni esporas (PETER *et al.*, 1986). En carnes con baja actividad de agua ( $A_w$ ) crece (SKOVGAARD, 1985), y su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 20-25 °C, si bien puede multiplicarse entre 0 y 30 °C (PETER *et al.*, 1986). Posee enzimas para el catabolismo de la glucosa tanto en la vía metabólica de las hexosas monofostato como en la glucólisis. La fermentación de la glucosa siempre resulta en la producción de L(+) ácido láctico, aunque se producen otros productos finales mayoritarios como son acetato, formato y etanol

(STACKEBRANDT y JONES, 2006). El valor óptimo de pH para su crecimiento es 7,0 pero en aerobiosis puede multiplicarse entre valores de pH de 5,0-9,0 (BROWNLIE, 1966).

*Brochothrix thermosphacta* es especialmente importante como microorganismo de deterioro en carne y productos cárnicos almacenado a temperaturas de enfriamiento (GARDNER, 1981). Diferente a bacterias de deterioro proteolíticas (ej.: *Pseudomonas*), *B. thermosphacta* es usualmente encontrada en la superficie de la carne (GILL y PENNEY, 1977). Sin embargo, FOURNAUD *et al.* (1980) demostró histológicamente que las bacterias de deterioro de la carne, incluyendo *B. thermosphacta*, pueden penetrar al interior del músculo. Ha sido aislada a partir de pieles de ganado (NEWTON *et al.*, 1978), contenido del rumen, pisos y equipamiento de la sala de faena (PATTERSON y GIBBS, 1978; TALON *et al.*, 1988) como también a partir de lana y heces de ovejas (TALON *et al.*, 1988).

#### **2.4.3.2 Bacterias ácido lácticas**

Las bacterias lácticas (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Carnobacterium* y *Streptococcus*) son ubicuas en la naturaleza y, dada su capacidad para crecer en condiciones ambientales variadas, resultan muy competitivas en la contaminación de los alimentos. Crecen en presencia de altas concentraciones de carbohidratos, productos de degradación de las proteínas y con tensiones de oxígeno y pH bajos, condiciones que habitualmente inhiben el crecimiento de otras bacterias (STAMER, 1976).

El género *Lactobacillus*, el más numeroso de las bacterias lácticas, está integrado por bacilos Gram-positivos, no esporulados, no pigmentados, anaerobios facultativos o microaerófilos, catalasa negativos, generalmente inmóviles. El ácido láctico constituye al menos la mitad de los productos finales de su metabolismo fermentativo, superando incluso el 80 % en los considerados homofermentativos. Su intervalo de temperatura de crecimiento se cifra entre 2 y 53 °C, con una temperatura óptima de 30-40 °C (KANDLER y NORBERT, 1986).

*Lactobacillus plantarum* crece a 4 °C y algunas especies como *Lactobacillus sake* y *Lactobacillus curvatus* pueden hacerlo a 2 °C (KANDLER y NORBERT, 1986). La limitación en la disponibilidad de oxígeno en la carne envasada al vacío y conservada en refrigeración favorece el crecimiento de los lactobacilos psicrótrofos frente a las *Pseudomonas* y otras bacterias (REUTER, 1981), ya que la falta de oxígeno no inhibe el desarrollo de la microbiota láctica mientras sí lo hace con la mayor parte de los microorganismos alterantes de la carne en aerobiosis.

Los lactococos, como *L. lactis* y *L. cremoris*, son cocos Gram-positivos, no formadores de esporas, anaerobios facultativos con una temperatura óptima de crecimiento alrededor de 30 °C, si bien algunos pueden crecer por debajo de los 10 °C.

El género *Leuconostoc* está integrado por bacterias Gram-positivas de forma esférica y a veces lenticular, catalasa negativas que se multiplican entre 2 y 30 °C.

Algunas bacterias lácticas como *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus curvatus* producen bacteriocinas que pueden inhibir el crecimiento de otras bacterias alterantes de la carne en anaerobiosis, como *Brochothrix thermosphacta* o enterococos, pudiendo utilizarse como cultivos biopreservadores en algunos productos cárnicos (METAXOPOULOS *et al.*, 2002).

*Carnobacterium spp.* son bacterias ácido lácticas ubicuas que se encuentran en distintos entornos, incluyendo pescado, carne, y una gran variedad de alimentos. El género *Carnobacterium* actualmente se divide en 10 especies: *Carnobacterium alterfunditum*, *C. divergens*, *C. funditum*, *C. gallinarum*, *C. inhibens*, *C. maltaromaticum*, *C. móvil*, *C. viridans*, *C. pleistocenium*, y *C. jeotgali*, una nueva especie aislada de un tradicional alimento fermentado coreano. Sólo dos especies, *C. divergens* y *C. maltaromaticum*, han sido aislados de diversos

alimentos, incluyendo el pescado, la carne y algunos productos lácteos. Las anteriores pueden crecer en los productos cárnicos a bajas temperaturas y son con frecuencia miembros predominantes de la microflora en carne cruda (res, carne de cerdo, cordero y aves de corral). Se encuentran en los productos cárnicos almacenados aeróbicamente, envasados al vacío o en atmósfera modificada (MAP). Además, especies de *Carnobacterium* son actualmente objeto de investigación, en particular por su efecto de inhibir microorganismos patógenos y de descomposición de la carne (CASABURI *et al.*, 2011).

## **2.5 Vida útil de cortes envasados al vacío**

La vida útil de los alimentos, tal como los cortes vacunos frescos, puede definirse como el tiempo máximo en el que los mismos mantienen sus cualidades nutricionales, sensoriales, microbiológicas y de seguridad alimentaria por encima de un nivel considerado como aceptable por los consumidores. En la actualidad existe una tendencia creciente por los consumidores de preferir aquellos alimentos percibidos como frescos y de los productores hacia una centralización de la distribución. Ambas tendencias implican que las estrategias para extender la vida útil deben ser efectivas en el ámbito de la producción mayorista manteniendo un producto con un aspecto lo más cercano al ideal de fresca.

El conocimiento de los mecanismos que producen la pérdida de la aceptabilidad permite plantear estrategias para extender la vida útil que no menoscaben las características nutricionales y sensoriales del alimento. En el caso de las carnes vacunas frescas es sabido que las causas microbiológicas son especialmente preponderantes dadas sus condiciones óptimas en nutrientes y las pocas barreras naturales que las mismas poseen para el desarrollo de una gran variedad de microorganismos. En forma general los cortes vacunos son rechazados por los consumidores cuando su carga microbiana total supera el umbral de  $10^7$  UFC/cm<sup>2</sup> y es debido a los productos que el metabolismo bacteriano genera. De acuerdo a esto, existe una relación directa entre la vida

útil, el recuento y tipo de microorganismos presentes en el momento inicial de la producción del corte vacuno. Distintos instrumentos de gestión de la calidad sanitaria como las Buenas Prácticas de Manufactura y la aplicación del Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP), aplicados tanto en la playa de faena como en el despostado y la preparación de los cortes, pueden minimizar dicha carga inicial, aunque no eliminarla. Otro parámetro fundamental para asegurar la vida útil de los cortes frescos es la temperatura de refrigeración ya que tiene un efecto directo en la velocidad de crecimiento microbiano el cual es acumulativo en el tiempo. Sin embargo, el control estricto de ambos parámetros (carga microbiana y temperatura) no es suficiente para alcanzar sino un período limitado de comercialización.

Por lo tanto y desde hace un tiempo, han surgido distintas alternativas para la extensión de la vida útil de los cortes frescos vacunos, sin producir cambios sensoriales notables en el producto a través de variantes de su envasado; por ejemplo: a través del envasado al vacío. Los envases empleados son especialmente diseñados para ofrecer una barrera efectiva al intercambio gaseoso con la atmósfera ambiente, modificando un aspecto crucial de la ecología microbiana de la carne. Básicamente el envasado al vacío, busca dificultar el desarrollo de aquellos grupos microbianos que más rápidamente deterioran los cortes vacunos como las bacterias aerobias Gram-negativas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, y reemplazarlos por microorganismos que se desarrollan más lentamente y con menor potencial para generar sustancias rechazadas por los consumidores como los *Lactobacillus*. Por otra parte, y con la finalidad de extender aún más la vida útil, el envasado al vacío puede a su vez ser aplicado sobre cortes vacunos sometidos a algún proceso de disminución de la carga microbiana inicial como puede ser la aplicación de sprays ácidos, el vapor ó aún la irradiación en bajas dosis (MASANA *et al.*, 2007).

### **2.5.1 Conservación de la carne mediante envasado al vacío**

El envasado al vacío consiste en la eliminación total del aire del interior del envase sin que sea reemplazado por otro gas, existiendo una diferencia de presión entre el exterior y el interior del envase (FAO, 2011).

El envasado al vacío, tiene como fin la protección de los productos cárnicos del contacto con el oxígeno del aire. El oxígeno promueve el crecimiento de microorganismos aeróbicos, que pueden modificar el olor, color y el aspecto de los productos cárnicos, causar oxidación de las grasas, cambiar los pigmentos de la carne, destruir vitaminas y sabores (SARANTÓPOULOS y SOLER, 1991).

Para tener éxito en la extensión de la vida útil de la carne al vacío y lograr un almacenamiento de ocho a más semanas, la temperatura de la carne deberá estar bajo los 10° C y lo más cercana a los 0°C. Además los animales antes del sacrificio no deben haber estado sometidos a ningún tipo de estrés y el enfriado post mortem debe haber sido adecuado (SCHÖBITZ, 1991).

Las bajas temperaturas prolongan el tiempo de almacenamiento de carne, sin embargo, la temperatura más baja que se puede utilizar sin que el producto se congele (-1,5 ° C) debe ser mayor que la temperatura mínima para el crecimiento de algunas bacterias psicrótrofas. La prevención del incremento en el recuento de organismos psicrótrofos requiere congelación (HOLLEY y GILL, 2005). A pesar de la creciente vida útil, la carne fresca envasada al vacío se deteriora después de algún tiempo.

La permeabilidad de la película utilizada en el envasado al vacío también afecta a la vida útil del producto. El sistema de envasado al vacío usa películas como barreras seguras y flexibles que tienen una baja permeabilidad al vapor de agua, los aromas y gases, especialmente oxígeno. La conservación del envasado al vacío se consigue mediante la completa extracción de aire del interior del envase y el sellado adecuado mediante el uso de máquinas de sellado al calor. Si el

producto contiene oxígeno disuelto, los microorganismos aerobios y microaerófilos todavía pueden crecer a temperaturas de refrigeración. Ésto ocurre si el material es relativamente permeable al oxígeno atmosférico. Así, las bajas concentraciones de oxígeno residual, especialmente en paquetes que contienen carne con un pH alto, pueden contribuir al rápido deterioro (HOLLEY y GILL, 2005).

En el envasado al vacío de la carne, la microbiota se determina por las condiciones ambientales: la temperatura, la humedad relativa, el oxígeno y la presión parcial de dióxido de carbono puede afectar el potencial de crecimiento de microorganismos anaerobios estrictos y facultativos. En general, el nivel de vacío que se utiliza por la industria de alimentos es bajo. Este nivel determina la cantidad de oxígeno residual en el producto y con ello el desarrollo microbiano. Durante el almacenamiento, sin embargo, la atmósfera sufre cambios. Después de la evacuación, el oxígeno restante se consume tanto por las actividades metabólicas de la carne como por las bacterias presentes en la superficie, lo que resulta en una reducción de la concentración de oxígeno al 1% y un aumento en la concentración del dióxido de a un 20-25% (EUSTACE, 1981).

El aumentar las concentraciones de CO<sub>2</sub> en el envase tiene sus ventajas, ya que es inhibidor frente a muchos microorganismos, incluidos mohos y *Pseudomonas*, las cuales constituyen la flora dominante de las carnes frescas alteradas. Las bacterias lácticas y las levaduras son mucho más resistentes a niveles altos de CO<sub>2</sub> (HAYES, 1993).

Así, el envasado al vacío es un microsistema anaeróbico / microaerofílico que retarda el crecimiento de bacterias aeróbicas tales como *Pseudomonas* y promueve el crecimiento de bacterias ácido lácticas, que tienen un menor riesgo de deterioro y su crecimiento es limitado a bajas temperaturas (SARANTÓPOULOS *et al.*, 2001).

Aún bajo condiciones ideales (falta de oxígeno y temperaturas de refrigeración), en los alimentos que no se cocinan, durante su almacenamiento, se pueden desarrollar patógenos, bacterias anaerobias y anaerobias facultativas. Si el alimento se somete a abusos de temperatura, la situación se agrava. El rápido crecimiento de psicrótrofos así como de algunas bacterias anaeróbicas mesófilas y anaeróbicas facultativas que son incapaces de crecer a temperaturas inferiores a 5 °C pueden desarrollarse durante el incremento de la temperatura, reduciendo drásticamente la vida útil o la seguridad del producto (RAY, 2004).

### **2.5.2 Alteraciones de la carne mediante envasado al vacío**

En el caso particular del envasado al vacío, si en éste no se consigue evacuar prácticamente todo el oxígeno o existen problemas de hermeticidad en el envase, las *Pseudomonas* proliferarán y alterarán la carne de igual modo que en condiciones aerobias. La alteración aparece entonces con densidades bacterianas de alrededor de  $10^6$  UFC/cm<sup>2</sup> (NEWTON *et al.*, 1977) debido al consumo de glucosa por los lactobacilos y a que las *Pseudomonas*, al crecer en concentraciones limitantes de oxígeno, degradan los aminoácidos incluso en presencia de glucosa (GILL, 1983).

La técnica del envasado de carne al vacío, ha significado un avance importante en la conservación de este producto por un tiempo prolongado, sin que sea necesaria su congelación. Para poder extender la duración es necesario sin embargo, almacenarla a una temperatura cercana a los 0°C. El desarrollo de microorganismos que afectan la conservabilidad de la carne y productos cárnicos, depende del pH. Con un pH elevado el riesgo de deterioro (degradación proteica, putrefacción) es mayor. La carne y productos cárnicos con pH superior a 6,0 son particularmente riesgosos (WIRTH, 1987). Las bacterias sensibles al ácido, especialmente *Enterobacteriaceae* y *Brochothrix*, pueden competir mejor bajo estas condiciones de pH más elevado (SCHÖBITZ *et al.*, 1990). Además debido a la falta de azúcares fermentables, se produce una

rápida degradación microbiana de aminoácidos, originando productos de olor desagradable como sulfuro de hidrógeno o amoníaco (SCHILLINGER y LÜCKE, 1991). JAY (2000), además señala, que cuando las carnes envasadas al vacío experimentan alteraciones, con frecuencia los organismos predominantes son lactobacilos, *Brochotrix thermosphacta* o ambos.

El deterioro de la carne envasada al vacío ocurre principalmente por *B thermosphacta*, *A. putrefaciens* y *E. liquefaciens*. *B. thermosphacta* se desarrolla en ausencia de oxígeno sólo a elevadas temperaturas y sobre todo, cuando se trata de carne DFD. El deterioro va acompañado de un olor ácido ligeramente “a encierro”. *A. putrefaciens* crece solamente en presencia de pH elevado (carne DFD), con la formación de color verdoso en la carne y un olor desagradable. *E. liquefaciens* también provoca el deterioro, sobre todo en carne DFD, con un olor desagradable, ligeramente acidulado (BEM y HECHELMANN, 1996).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

El objetivo general del presente estudio fue evaluar la dinámica poblacional bacteriana y los cambios fisicoquímicos en cortes de bife angosto (*Longissimus dorsi*) bovinos, envasados al vacío y almacenados durante 142 días a una temperatura de 0 °C.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Estudiar el desarrollo de microorganismos en carne envasada al vacío y almacenada a 0°C.
- Determinar el perfil microbiano de la carne al día cero de su envasado al vacío.
- Determinar la dinámica microbiológica a los 14, 91 y 142 días de almacenamiento a 0°C.
- Caracterizar genótipicamente los microorganismos aislados basándose en la secuenciación del gen 16s rRNA.
- Evaluar los cambios de pH, porcentaje de humedad y color en las muestras de bife angosto envasadas al vacío durante las diferentes etapas de almacenamiento a 0°.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Preparación y esquema de muestreos**

Las muestras de carne vacuna fueron tomadas en la sala de desosado de la planta procesadora de carne Frigorífico San Jacinto – NIREA S.A., luego de 36 horas de pre-frío a 4,5°C de las canales utilizadas. Durante el proceso de desosado, se eligieron aleatoriamente 4 cortes de bife angosto (*Longissimus dorsi*) de aproximadamente 5 kg cada uno. Cada bife angosto, a su vez, fue fraccionado en ocho muestras de 500 gramos cada una, obteniendo un total de 32 fracciones de carne.

Las muestras anteriores fueron envasadas individualmente al vacío en máquina envasadora Cryovac - Sealed air, modelo VS95TS, origen Suiza, empleando bolsas retráctiles Cryovac® del tipo BB4LA (permeabilidad al oxígeno 14 cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>/24 hrs.) y pasando por un proceso de termocontracción en agua a 84°C por 1 a 2 segundos. Luego se identificaron y almacenaron en cajas de cartón a 0°C ±1°C en cámara frigorífica, en las mismas condiciones que las carnes comercializadas.

Los diferentes análisis de las muestras fueron obtenidos en el día 0, y a los 14, 91 y 142 días de almacenamiento en cámara frigorífica en las condiciones previamente descriptas. Se transportaron las muestras refrigeradas a 4° C al Laboratorio de la Unidad de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Agronomía para su análisis y los duplicados se procesaron de manera simultánea en el Laboratorio de microbiología de la empresa que colaboró en el estudio, para completar los análisis correspondientes a cada Laboratorio.

### **4.2 Recuento microbiológico**

Se procesaron 10 g de una porción de cada muestra de bife (con remoción de la parte externa con hoja de bisturí y pinzas estériles), se le agregó 90 mL de caldo

peptonado al 0.1%, pH=7, y se homogenizó en un Stomacher Lab-Blender (model 400; A. J. Seward Laboratory, London, England), por dos minutos y medio a 260 rpm a temperatura ambiental en bolsas estériles microbiológicas. Se prepararon diluciones decimales con solución salina fisiológica (SSF, 0.85% NaCl), para los siguientes análisis microbiológicos realizados por triplicado:

- a) Recuento total de mesófilos aerobios en agar Plate Count (PCA) (OXOID, USA), a 30° C por 72h.
- b) Recuento total de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) en agar Man Rogosa Sharpe (MRS) (OXOID, USA), pH 6,5 a 30° C por 72h en condiciones microaerofilícas.
- c) Recuento de bacterias Psicrótrofas en PCA, incubadas a 7° C por 10 días.
- d) Recuento de *Brochotrix thermosphacta* en agar selectivo base (sulfato de estreptomicina/acetato de talio/actidiona) STAA + suplemento selectivo STAA (OXOID, USA), incubado a 25° C por 48h ± 4h.  
Se sembraron 100 µL de las diluciones preparadas anteriormente en la superficie de los medios a, b, c y d.
- e) Recuento de Coliformes Totales en Petrifilm (3M, USA), a 30°C±1°C por 72h, para ello se utilizó 1 ml de las diluciones previamente preparadas.
- f) Presencia/Ausencia de Salmonella en pool correspondiente a 25 gramos de cada muestra a analizar, utilizando kit comercial (Salmonella Rapid Test – OXOID, USA) y siguiendo instrucciones del fabricante.
- g) Presencia/Ausencia de *E. coli* O157:H7 por método de screening con tirillas reactivas (Reveal *E.coli* O157:H7 Test System - Neogen, USA). (USDA/FSIS, 2010).

Los recuentos microbianos fueron transformados y expresados en Log<sub>10</sub> UFC/g (para incisos a, b, c, d y e).

### **4.3 Medición de pH**

Las medidas de pH se realizaron utilizando un pH-metro (I.Q. Scientific, modelo IQ159, U.S.A.) con electrodo de penetración (Crison, modelo 52-32, España). El pH-metro fue calibrado, previo a su uso, utilizando buffer pH=7,00 y pH=4,00. Para realizar la medida se realizó un corte en la superficie de la carne de aproximadamente 2 centímetros. Cada medición se realizó por duplicado.

### **4.4 Determinación del porcentaje de humedad**

La determinación de humedad, se realizó mediante corte de la muestra en pequeños trozos y pasándose por picadora de carne (Picadora CAF, modelo 101, Brasil) a través de disco de 5 mm. Luego se procesó en procesadora doméstica (Procesadora Philips, modelo Cucina, Brasil) hasta la obtención de una mezcla homogénea, tipo pasta.

Se tomó 3 a 4 gramos de cada muestra procesada y la determinación del porcentaje de humedad se realizó por secado en horno microondas con balanza analítica (Equipo CEM, modelo Smart System 5, USA). La pérdida de agua determinada como diferencia de peso entre la muestra inicial y la muestra secada es expresada como porcentaje de humedad (AOAC, 1995).

### **4.5 Medición de color**

La evaluación de color fue realizada mediante un medidor croma CR-100 Minolta (Minolta Corp., Ramsey, NJ). En cada período se abrieron 4 paquetes al vacío correspondientes a cada una de los 4 bifes angostos analizados. Se registraron la luminosidad ( $L^*$ ), tonalidades de rojo-verde ( $a^*$ ) y las tonalidades de amarillo-azul ( $b^*$ ) para cada una de las muestras en cada período de muestreo. A partir de los parámetros  $a^*$  y  $b^*$  se calculó el índice de tono ( $H^*$ ) como  $H^* = \arctan(b^*/a^*)$ . En cada una de las muestras se realizaron 6 mediciones aleatorias en la superficie de corte del bife y los valores fueron promediados para conocer el registro de cada una de las muestras.

## **4.6 Identificación de aislamientos y caracterización genotípica**

A partir de los distintos medios de cultivos selectivos (incisos a, b, c y d del punto 3.2) se seleccionaron al azar 11 aislamientos para cada muestra en cada período de muestreo. Los aislamientos seleccionados fueron sometidos a técnicas bioquímicas de rutina para la identificación de las cepas predominantes, también se caracterizaron genéticamente luego de la extracción del ADN para la secuenciación del gen 16S rRNA. La información obtenida se utilizó para establecer las proporciones de las cepas bacterianas predominantes en las muestras procesadas en los diferentes períodos de almacenamiento.

### **4.6.1 Caracterización genotípica**

La extracción de ADN se realizó a partir de cultivos líquidos incubados por 24 horas, utilizando un Kit comercial ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep (ZYMO RESEARCH, USA). La amplificación del gen 16S rRNA se realizó con primers y oligonucleótidos descritos por WEISBURG *et al.* (1991), fD1 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3') y rD1 (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC- 3'). La mezcla final fue de 50 µL, cada primer utilizado fue utilizado a 0.2 µM, cada deoxynucleótido trifosfato a una concentración de 0.2 µM, 25 µM MgCl<sub>2</sub>, 5 µL de Buffer PCR al 10X, y 2.5 U de polimerasa Taq (Invitrogen). Las condiciones de PCR consistieron en 35 ciclos (1 min a 94° C, 1 min 56° C, y 1 min 72° C) más ciclo adicional a 72° C por 10 min para la elongación de la cadena (BRIGHTWELL G. *et al.*; 2009). A 10 µL del producto amplificado de cada cepa aislada fue examinado en geles al 1% de agarosa por electroforesis y visualizado con Good View (SBS Genetech Co.,Ltd. China) por UV verificando la presencia de los productos de amplificación.

#### **4.6.2 Secuenciación del gen 16S rRNA**

Los productos de PCR desde el gen 16S rRNA (aproximadamente 1540), fueron purificados y secuenciados por MacroGen Sequencing Service, Korea utilizando un ABI PRISM 3730XL capillary sequencer (Applied Biosystems, CA, USA). Las secuencias de ADN fueron comparadas con las reportadas en la base de datos por NCBI Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) buscando las cepas bacterianas con mayor similitud (>97%).

#### **4.7 Estadística**

Los datos obtenidos para los parámetros de color fueron analizados de acuerdo a un modelo de medidas repetidas en el tiempo utilizando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS. El cambio en el parámetro  $L^*$  de acuerdo al tiempo de almacenamiento fue ajustado a modelos lineales utilizando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Aislamientos y recuentos de diferentes grupos bacterianos.

La evolución de la microbiota de la carne envasada al vacío, valorada a través de recuentos de mesófilos aerobios, bacterias aerobias psicrótrofas, bacterias ácido lácticas (BAL), coliformes totales y *Brochothrix thermosphacta*, se detallan en la Tabla 1.

Día	Recuento Mesófilos aerobios	Recuento de BAL	Recuento Coliformes totales	Recuento Psicrótrofos aerobios	Recuento <i>B.thermosphacta</i>
0	2,54 ± 0,20*	2,04 ± 0,09	1,82 ± 0,99	1,39 ± 0,27	1,36 ± 0,15
14	3,68 ± 0,15	2,15 ± 0,17	2,68 ± 0,21	3,51 ± 0,14	1,79 ± 0,21
91	5,17 ± 0,15	5,00 ± 0,26	4,38 ± 0,12	4,88 ± 0,34	3,53 ± 0,11
142	7,08 ± 0,45	7,27 ± 0,23	5,87 ± 0,77	6,81 ± 0,51	4,91 ± 0,06

\*( $\pm$ ) Desviación estándar

**Tabla 1.** Recuento de grupos bacterianos (media recuento Log<sub>10</sub> UFC/g) en diferentes días de almacenamiento a 0°C ± 1°C.

En la Tabla 1 se aprecia un incremento en los recuentos de mesófilos aerobios, bacterias aerobias psicrótrofas, bacterias ácido lácticas (BAL), coliformes totales y *Brochothrix thermosphacta* según avanza el tiempo de almacenamiento de la carne en refrigeración, con ausencia de patógenos como *Salmonella* y *E.coli* O157:H7.

La media de recuentos de mesófilos aerobios fue de 2.54, 3.68, 5.17 y 7.08 Log<sub>10</sub> UFC/g para 0, 14, 91 y 142 días de almacenamiento, respectivamente. La media de recuentos de BAL fue de 2.04, 2.15, 5.00 y 7.27 Log<sub>10</sub> UFC/g para 0, 14, 91 y 142 días de almacenamiento, respectivamente. La media de recuentos de Coliformes totales fue de 1.82, 2.68, 4.38 y 5.87 Log<sub>10</sub> UFC/g para 0, 14, 91 y

142 días de almacenamiento, respectivamente. La media de recuentos de bacterias aerobias psicrótrofas fue de 1.39, 3.51, 4.88 y 6.81 Log<sub>10</sub> UFC/g para 0, 14, 91 y 142 días de almacenamiento, respectivamente, mientras que para *Brochothrix thermosphacta* la media de recuentos fue de 1.36, 1.79, 3.53 y 4.91 Log<sub>10</sub> UFC/g para 0, 14, 91 y 142 días de almacenamiento, respectivamente.

Para el grupo de mesófilos aerobios se obtuvo el mayor recuento inicial en comparación con el resto de los grupos bacterianos, pero a pesar de ello, los recuentos de los diferentes grupos bacterianos fueron bajos previo al almacenamiento de la carne a 0°C (día 0). Además, los recuentos iniciales de mesófilos aerobios y coliformes totales se encontraron dentro de las especificaciones que maneja la Empresa en la que se realizó el estudio (5 Log<sub>10</sub> UFC/g y 3 Log<sub>10</sub> UFC/g respectivamente).

Por otro lado, los recuentos iniciales de mesófilos aerobios, psicrótrofos aerobios y coliformes totales, indicaron que las condiciones de manejo en la cadena de proceso previo al empaque fueron adecuadas, es decir, que las buenas prácticas de manufactura fueron respetadas.

El recuento inicial obtenido para bacterias aeróbicas psicrotrófas concuerda con el obtenido por SCHÖBITZ *et al.* (1990), los cuales realizaron un estudio similar, conservando la carne de pH normal envasada al vacío a -2°C, 4°C y 8°C, estos autores obtuvieron recuentos de bacterias aerobias psicrotrófas, al tiempo 0 de menos de 2,00 Log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup>.

En la Tabla 1, se observa que a los 14 días de almacenamiento el incremento en el recuento de bacterias aerobias psicrótrofas fue aproximadamente de 2,12 ± 0,18 Log<sub>10</sub> UFC/g, mientras que para el resto de los grupos bacterianos no se supera el valor antes mencionado. FANDIÑO *et al.* (1989), después de un breve período de latencia ocasionado por el calentamiento del empaque de la carne para retraer la película plástica, obtuvieron en carne de cerdo un rápido

incremento en el recuento de este grupo bacteriano que concuerda con lo sucedido en nuestro estudio.

Es importante destacar, que las bacterias psicrótrofas incrementaron en 14 días debido a las condiciones ambientales, como la cantidad de oxígeno disponible y la falta de competencia por otros grupos bacterianos más exigentes. En este punto es importante señalar que la mayoría de las bacterias mesófilas aerobias se pueden comportar como psicrótrofas en las condiciones adecuadas de crecimiento.

A diferencia de lo sucedido con las bacterias aerobias psicrótrofas, a los 14 días de almacenamiento el incremento en el recuento de bacterias ácido lácticas fue el menor (Tabla 1). Lo anterior puede explicarse por la baja temperatura de almacenamiento de la carne envasada al vacío, como lo es el caso de esta investigación (0°C), en la que las bacterias ácido lácticas (BAL) requieren de un largo periodo de adaptación, para posteriormente aumentar su capacidad de multiplicarse (SCHILLINGER y LÜCKE, 1987). Las bacterias ácido lácticas (BAL) necesitan de condiciones ambientales con bajas tensiones de oxígeno, por lo que el incremento observado se debe a la disponibilidad del mismo. El crecimiento de los diferentes grupos bacterianos durante el almacenamiento se propició por los cambios de consumo de oxígeno y productos metabólicos que disminuyen el pH, lo que favorece el crecimiento de las BAL en instancias posteriores de almacenamiento.

Este mismo comportamiento fue obtenido por SCHÖBITZ *et al.* (1990) quienes obtuvieron una larga fase de latencia a -2°C y recién a los 35 días de almacenamiento observaron un notorio aumento de dichas bacterias. En nuestro estudio se obtuvo un aumento notorio en el recuento de las BAL a los 91 días de almacenamiento (Tabla 1).

Por otro lado, en la Tabla 1, se observa que éste grupo bacteriano alcanzó el mayor recuento al final del período de almacenamiento. El recuento de BAL a los

142 días ( $7,27 \pm 0,23 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ ) es similar al obtenido en el trabajo experimental realizado por DE PABLO *et al.* (1989), en el que se alcanzó un valor de  $8,0 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ . Por otro lado, VENUGOPAL *et al.* (1993), estudió el efecto del crecimiento microbiano en carne fresca envasada al vacío a las temperaturas de 0, 2 y 4 °C, por 60 días de almacenamiento, y el recuento de BAL fue de  $7,8 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$  a los 60 días.

El mayor recuento alcanzado para las bacterias ácido lácticas es común en el envasado al vacío ya que, como se comentó anteriormente, el ambiente generado y las condiciones de almacenamiento, favorecen su crecimiento. Las bacterias ácido lácticas, no requieren oxígeno para su crecimiento, son resistentes a la inhibición por dióxido de carbono y toleran valores más bajos de pH que otros grupos bacterianos (EGAN, 1983).

El recuento de *B. thermosphacta* en la primera etapa de almacenamiento (0 y 14 días de almacenamiento) fue bajo, observándose un incremento considerable recién a los 91 días (Tabla 1). Un comportamiento similar en el crecimiento de *B. thermosphacta* se observó en el estudio realizado por SCHÖBITZ *et al.* (1990), éstos autores obtuvieron para cortes *semitendinosus* envasados al vacío y almacenados a -2°C, recuentos muy bajos al inicio del estudio, observándose recién a los 50 días un aumento numérico superior a un logaritmo.

El crecimiento observado para *B. thermosphacta* pudo deberse a un pH inicial elevado (6,25 unidades de pH) o a la acumulación de pequeñas concentraciones de oxígeno en el interior de las bolsas, que permitieron el desarrollo posterior de la misma. Esto puede traer como consecuencia el acortamiento de la vida útil de la carne, ya que este microorganismo puede producir una rápida degradación de aminoácidos originando olores desagradables y un olor "dulzón " en la carne. Según CAMPBELL *et al.* (1979), ésta bacteria puede contribuir de manera importante al deterioro de la carne envasada al vacío, si ésta no cumple con las condiciones de baja concentración de oxígeno y pH.

## 5.2 Caracterización genotípica de diferentes grupos bacterianos

En la Tabla 2 se muestra el porcentaje de los grupos bacterianos identificados por secuenciación del gen 16S rRNA en las distintas etapas de almacenamiento a 0°C. En la misma se observa una considerable diversidad microbiana, incluyendo enterobacterias, *Pseudomonas* y *Carnobacterium*, las cuales fueron encontradas tanto en el grupo bacteriano de mesófilos, psicrótrofos y BAL. Además, la especie *B. thermosphacta*, identificada en este trabajo y no existiendo a la fecha información en Uruguay por no considerarse como bacteria patógena, es considerada muy importante en el deterioro en la carne ya que contribuye a la alteración de las características organolépticas y al acortamiento de la vida útil en carnes envasadas al vacío.

En relación al grupo de bacterias mesófilas aerobias, en todo el período de almacenamiento, se identificaron siete géneros predominantes bacterianos. Al día 0, especies del género *Rahnella* (31.0%), fueron las predominantes, mientras que *Acinetobacter sp* (12.5%), *Flavobacterium sp* (1.5%), *Lactobacillus* (1.5%), *Serratia* (12.5%) y *Pseudomonas* (12.5%) fueron los menos frecuentes. A los 14 días predominaron las *Pseudomonas* (37.5%), mientras que el género *Carnobacterium* fue identificado a los 91 días de almacenamiento (57.0%) y predominó al final del período (57.5%).

<b>% Mesófilos aerobios</b>	0 días	14 días	91 días	142 días
<i>Rahnella</i>	31.0	14.2	4.0	
Cocos	23.8			
<i>Acinetobacter sp</i>	12.5	12.5		
<i>Flavobacterium sp</i>	1.5			
<i>Pseudomonas sp</i>	12.5	37.5		
<i>Serratia</i>	12.5	14.5	26.1	21.4
<i>Carnobacterium divergens</i>			57.0	57.5
<i>Lactobacillus</i>	1.5	5.0	8.0	12
Otras	4.7	16.3	4.9	9.1
<b>% Psicrótrofos</b>	0 días	14 días	91 días	142 días
<i>Rahnella aquatilis</i>	46.5	6.1	2.9	
<i>Pseudomonas fragi</i>	37.5	36.9		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4.6	24.0		
Otras <i>Pseudomonas</i>	4.6	20.7		
<i>Flavobacterium sp</i>	1.0	1.0		
<i>Carnobacterium divergens</i>			55.2	69.4
<i>Serratia sp</i>		4.1	25.3	3.9
<i>Erwinia amylovora</i>				7.0
<i>Brochothrix</i>			8.0	11.0
Otras	5.8	7.2	8.6	8.7
<b>% Bacterias ácido lácticas</b>	0 días	14 días	91 días	142 días
<i>Lactobacillus curvatus</i>	25.0	22.2	22.6	29.5
<i>Carnobacterium divergens</i>	68.2	72.0	71.0	61.3
<i>Leuconostoc carnosum</i>			2.5	6.5
Otras	6.8	5.8	3.9	2.7
<b>% Brochothrix</b>	0 días	14 días	91 días	142 días
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	100	93.5	100	100

**Tabla 2.** Especies identificadas por secuenciación del gen 16S rRNA para los diferentes grupos bacterianos y porcentaje de géneros predominantes en las diferentes etapas de almacenamiento a 0°C.

De los géneros identificados en el grupo de bacterias mesófilas, cinco fueron identificados dentro del grupo bacteriano de psicrótrofos y dos en el de bacterias ácido lácticas. Al día 0 de almacenamiento, el género *Rahnella* fue identificado con mayor frecuencia tanto en el grupo de los mesófilos (31.0%) como en el de los psicrótrofos, en éste último a través de la especie *Rahnella aquatilis* (46.5%). Por otro lado, al final del período de almacenamiento, la especie de *Carnobacterium divergens* fue la predominante tanto en el grupo bacteriano de mesófilos aerobios (57.5%), como en el de psicrótrofos (69.4%), mientras que en el grupo de bacterias ácido lácticas, predominó al día 91 de almacenamiento (71.0%) (Tabla 2).

Por otro lado, la presencia de *Rahnella sp* y *R. aquatilis* al inicio del almacenamiento puede ser explicada por el hecho de que esta bacteria es inhibida por altas concentraciones de oxígeno, o por competencia de otras bacterias de deterioro en condiciones altamente aeróbicas (ERCOLINI *et al.*, 2006). Las condiciones de envasado, en la que existe baja disponibilidad de oxígeno, permiten su predominio al día 0 y su identificación en etapas posteriores en menor porcentaje. *Rahnella sp* y *R. aquatilis* (ERCOLINI *et al.*, 2006).

Según se muestra en la Tabla 2, la especie *Erwinia amilovora* perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, fue identificada dentro del grupo de psicrótrofos hacia el final del período pero con un bajo porcentaje (7.0% a los 142 días), sin embargo especies del género *Serratia*, también perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, fueron encontradas dentro del grupo de psicrótrofos y mesófilos aeróbicos en etapas anteriores de almacenamiento.

Por otro lado, en la Tabla 2, se puede notar que para el grupo de bacterias psicrótrofas, a medida que se prolongó el tiempo de almacenamiento en refrigeración, el recuento de la microflora se incrementó en variación de los

géneros bacterianos predominantes al final del estudio, lo contrario sucede para el grupo de bacterias mesófilas aeróbicas.

Las especies de bacterias ácido lácticas aisladas fueron la mayoría *C. divergens*, y en menor porcentaje *Lactobacillus curvatus* y *Leuconostoc carnosum*, mientras que dentro del género *Brochothrix*, la especie *B. thermosphacta* fue identificada durante todo el período de almacenamiento, al igual que *C. divergens* dentro del grupo de bacterias ácido lácticas (Tabla 2).

La eficacia del envasado al vacío en el almacenamiento de la carne está básicamente relacionada con la inhibición de bacterias aeróbicas Gram-negativas, como son especies del género *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, y de la familia de *Enterobacteriaceae*, mientras que las bacterias Gram-positivas, tales como bacterias ácido lácticas, pueden crecer en éstas condiciones (ERCOLINI *et al.*, 2011). Por lo tanto, el crecimiento de las bacterias ácido lácticas son importantes para prevenir el crecimiento de bacterias relacionadas con el deterioro debido a la producción de ácidos orgánicos y bacteriocinas (ERCOLINI *et al.*, 2006). Lo anterior coincide con lo reportado en nuestro estudio, en que las especies de los géneros y familia mencionados anteriormente predominaron al inicio del almacenamiento pero disminuyeron su recuento hacia el final, mientras que especies de bacterias ácido lácticas (*C. divergens* y *L. curvatus*) predominaron hacia el final del período de almacenamiento (142 días).

A pesar de lo anterior, para el caso de *B. thermosphacta*, su porcentaje de prevalencia no fue afectado por el predominio de bacterias ácido lácticas. Según GRAU (1980) en ausencia de oxígeno la presencia de ácido láctico, favorecido por el crecimiento de las bacterias lácticas, inhibe el crecimiento de *B. thermosphacta* a bajos valores de pH. Ésto concuerda con lo mencionado en la sección anterior (Sección 5.1) en que el crecimiento de esta especie se favorece por pH inicial de la carne elevado para su envasado. Por otro lado, GILL Y

HARRISON (1989), observaron que cuando los niveles iniciales de esta bacteria son altos, las condiciones del vacío les permiten desarrollarse a pesar del predominio de las bacterias lácticas. En nuestro caso, el recuento inicial de *B. thermosphacta* obtenido fue  $1,36 \pm 0,15 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$  incrementando  $3,55 \pm 0,13 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$  hasta el final del período, por lo que las bacterias ácido lácticas no ejercieron un efecto inhibitorio sobre *B. thermosphacta* en etapas tardías de almacenamiento.

### 5.3 Evaluación fisicoquímica de las muestras de carne durante las diferentes etapas de almacenamiento a 0°C.

#### 5.3.1 Evaluación del pH y Humedad

La variación del pH de las muestras de carne envasadas al vacío durante el período de almacenamiento se muestra en la Tabla 3. En la misma se observa que al día 0 se partió de un valor de pH de  $6,25 \pm 0,17$  unidades de pH, y disminuyó hasta alcanzar a los 142 días un valor de  $5,83 \pm 0,10$  unidades de pH; éste último indica que la carne no alcanzó un pH adecuado de maduración (menor a 5,8 unidades de pH) quizás por el valor elevado de pH que presentaba al comienzo del estudio.

Día	0	14	91	142
pH	$6,25 \pm 0,17^*$	$5,92 \pm 0,12$	$5,93 \pm 0,09$	$5,83 \pm 0,10$

\*( $\pm$ ) Desviación estándar

**Tabla 3.** Promedio y desviación estándar de medidas de pH en muestras de bife angosto analizadas en los diferentes días de almacenamiento a 0°C.

El descenso paulatino de pH observado en la Tabla 3, puede estar relacionado con el crecimiento y la competencia generada por distintos géneros de bacterias ácido lácticas que llegan a ser al final del almacenamiento las cepas predominantes. Dado que el ácido láctico constituye al menos la mitad de los productos finales de su metabolismo fermentativo, superando incluso el 80 % en los considerados homofermentativos (KANDLER, 1986), éstas bacterias contribuyen a la acidificación de la carne llevando a una disminución en su pH.

Por otro lado, en la Tabla 4 se muestran los resultados del porcentaje de humedad en las muestras analizadas a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento. En la misma se muestran los resultados a partir de que las muestras fueron envasadas al vacío y almacenadas a 0°C por 142 días.

Día	14	91	142
% de Humedad	65,54 ± 1,92*	64,30 ± 2,90	61,62 ± 1,93

\*(±) Desviación estándar

**Tabla 4.** Promedio y desviación estándar del porcentaje de humedad de muestras de carne analizadas en diferentes etapas de almacenamiento a 0°C.

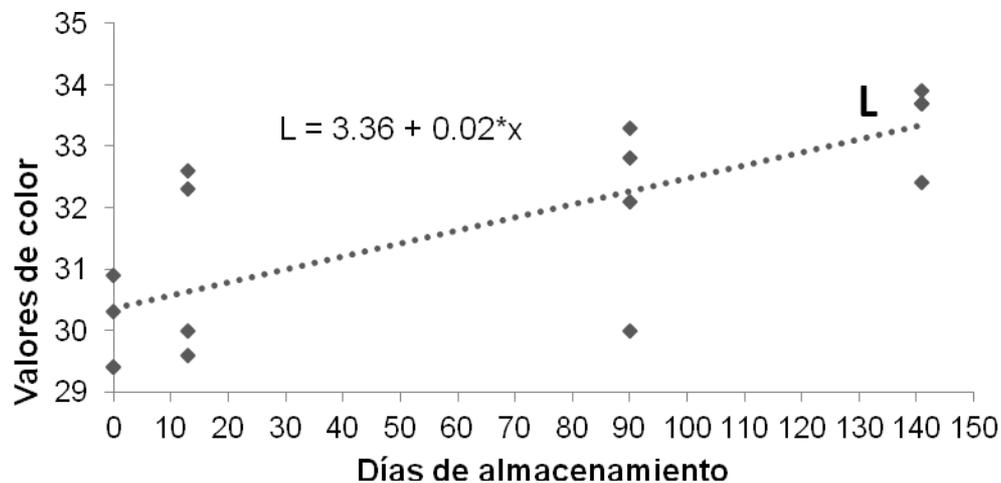
En la Tabla 4 se observa que durante el almacenamiento de la carne envasada al vacío hubo variaciones en el porcentaje de humedad pero debido a los altos valores de desviación estándar obtenidos, dichas diferencias no se podrían considerar como significativas.

Es importante resaltar que las carnes con un pH mayor a 5,8, como es nuestro caso, presentan mayor jugosidad que las carnes con pH normal, por lo que presentan mayor retención de agua. GALLO (1991), KATSARAS y PEETZ (1990), señalan que la carne con pH alto, posee escasa pérdida de agua

durante el calentamiento o cocción, puesto que aumenta considerablemente la fijación del agua, siendo una carne más jugosa y tierna al momento de su consumo.

### 5.3.2 Evaluación del color

En la Figura 3 se presenta el ajuste de la ecuación de predicción para el comportamiento de la variable de color L\*.

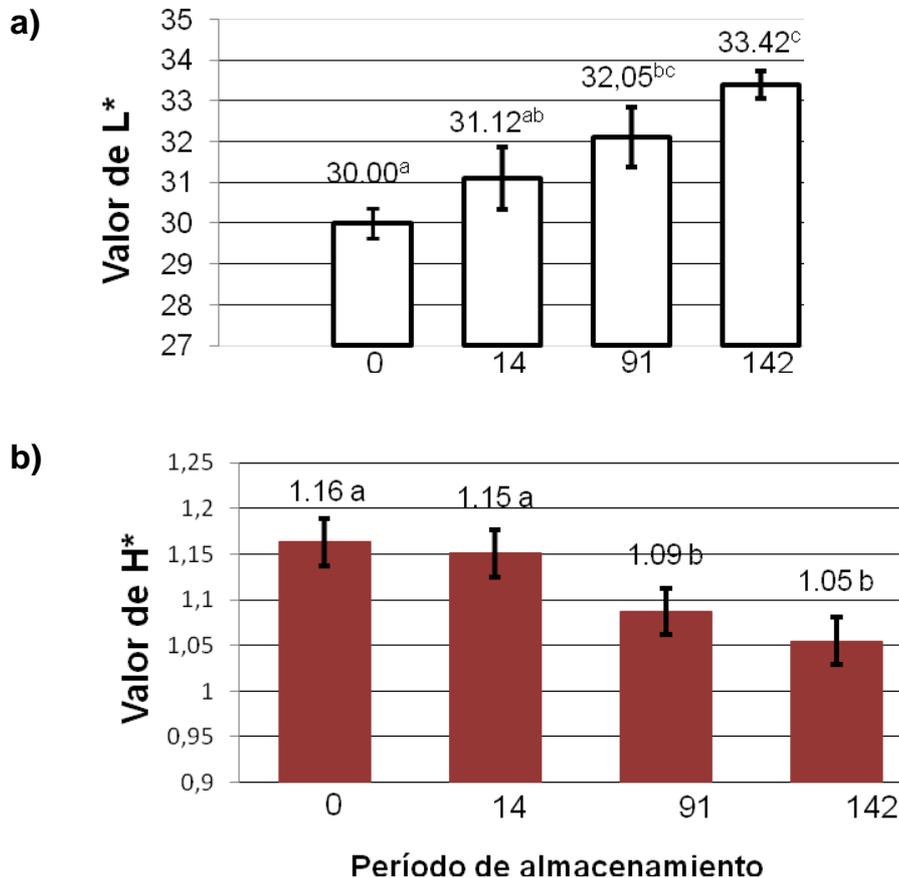


**Figura 3.** Ajuste de ecuación lineal para los valores de L\* de las muestras evaluadas en diferentes períodos de almacenamiento

La ecuación de mejor ajuste para L\* fue lineal y altamente significativa ( $P < 0.001$ ), con coeficiente de determinación de 0.56 y estimadores del coeficiente lineal altamente significativos ( $P < 0.01$ ).

En la Figura 4, se observa la representación gráfica de los datos obtenidos para el parámetro L\* y el índice de tono H\*. El parámetro L\* incrementa significativamente de una etapa a otra de almacenamiento ( $P < 0.01$ ). El índice de tono disminuye lentamente desde el inicio del período de almacenamiento, luego

de los 14 días de almacenamiento disminuye significativamente y continúa disminuyendo hacia el final del mismo.



**Figura 4.** Valores de L\* y H\* de muestras de bife angosto (n=4) almacenados al vacío bajo refrigeración en cuatro períodos de muestreo. Letras diferentes entre las medias de barras del mismo gráfico difieren significativamente (P<0.01).

El incremento significativo y lineal obtenido para el parámetro L\* durante el período de almacenamiento (Figura 3 y 4) puede ser consecuencia de la desintegración del disco Z del músculo lo que permite que la luz difunda en mayor cantidad (OLIETE *et al.*, 2006).

En cuanto al índice de tono H\*, el mismo se encuentra relacionado al estado de oxidación del grupo hemo. La disminución observada en la Figura 4 para el

índice de tono durante la etapa de almacenamiento puede estar relacionada a la formación de distintos porcentajes entre oximioglobina y metamioglobina a medida que avanza el tiempo (FRANCO *et al.*, 2008) y (O'KEEFFE Y HOOD, 1982).

Si bien al inicio no se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.01$ ), otros autores consideran que ésta disminución puede estar dada por pequeñas concentraciones de oxígeno que quedan en el interior del envase en el momento del envasado y la pérdida de la actividad respiratoria de las mitocondrias, que hacen que el oxígeno esté más disponible en la superficie del músculo y se pueda utilizar para formar un mayor porcentaje de oximioglobina que le da el color rojo fuerte a la carne (OLIETE *et al.* 2006).

Por otro lado, el descenso significativo del índice de tono luego de los 14 días de almacenamiento (Figura 4) podría deberse a la baja disponibilidad de oxígeno en dicha instancia de almacenamiento, esto hace que el hierro del pigmento hemo se oxide contribuyendo a un aumento en el porcentaje de metamioglobina, la cual es responsable de otorgarle un color pardo a la carne. En este punto cabe resaltar que la empresa en donde se realizó el estudio no ha tenido experiencias en coloración de cortes envasados al vacío y almacenados en frío en las que la aceptación por parte del consumidor se viera comprometida.

También se debe señalar que el color es un importante indicador de calidad de la carne; dado que durante el almacenamiento ocurren cambios visibles en la superficie del músculo. El color tiene influencia en la aceptación por parte del consumidor, determinando el rechazo de aquellos cortes que no tengan una apariencia de carne fresca. Tal situación determina que la industria continúe esforzándose para incrementar la estabilidad del color *post-mortem* de los distintos cortes de carne, manteniendo el color rojo brillante (FRANCO *et al.*, 2008).

## 6. CONCLUSIONES

El objetivo general del estudio fue evaluar la dinámica poblacional bacteriana y los cambios fisicoquímicos en cortes de carne bovina, envasados al vacío y almacenados durante 142 días a una temperatura de 0 °C, con el fin de establecer las bases para determinar un tiempo estimativo en el que las condiciones de la carne sean aptas para el consumidor.

- Es el primer trabajo en Uruguay que reporta la presencia de *Brochothrix thermosphacta* en carnes envasadas al vacío durante su almacenamiento en frío, y su importancia actual radica en determinar la vida útil del producto.
- Los recuentos iniciales para los grupos bacterianos de bacterias ácido lácticas, bacterias psicrótrofas, mesófilos aerobios y coliformes totales fueron bajos. Además, los mesófilos aerobios y coliformes totales se encontraron dentro de las especificaciones que maneja la Empresa en la que se realizó el estudio.
- Los recuentos iniciales de bacterias psicrótrofas, mesófilos aerobios y coliformes totales aportaron información de las condiciones de la carne previo al envasado, pudiéndose decir que la operativa industrial fue la adecuada.
- El crecimiento de *Brochothrix thermosphacta* fue favorecido por el pH inicial elevado de la carne. Además, su presencia durante todo el período de almacenamiento indicó que no fue afectada por bacteriocinas o disminución de pH por las bacterias ácido lácticas.
- El recuento y predominio de las bacterias ácido lácticas fue el mayor a los 142 días de almacenamiento, demostrando que las condiciones de envasado favorecen su crecimiento, como también la inhibición de bacterias aeróbicas Gram-negativas causantes de deterioro. La especie predominante en dicha instancia fue *Carnobacterium divergens* y en menor medida *Lactobacillus curvatus*.

- La carne almacenada al vacío no alcanzó el pH de maduración adecuado (menos de 5,8) debido a su valor inicial elevado. A pesar de ello desde el punto de vista microbiológico y fisicoquímico la carne se comportó de forma similar a una carne envasada al vacío con pH normal.
- Desde el punto de vista microbiológico la carne envasada al vacío y almacenada por 142 días a 0°C, no estaría apta para el consumo ya que se estima que una carne está microbiológicamente alterada cuando el número de aerobios totales y/o enterobacterias es superior a 7,00 Log<sub>10</sub> UFC/g (ICMSF, 1984), y en nuestro estudio a los 142 días de almacenamiento la carne no cumple con dicho requisito.
- Considerando tanto el límite microbiológico suficiente para alterar la carne, como la aceptabilidad sensorial, que es en definitiva el principal criterio de compra por parte del consumidor, la carne envasada al vacío con un pH inicial mayor a 5,8 podría ser almacenada a 0°C por un período no mayor a 90 días.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

AOAC. Official Methods of Analysis (1995). Moisture in Meat and Poultry Products. Rapid Microwave Drying Method. 2: 62.

ADAMS, M.R y HALL, C.J. (1988). Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and other mixtures. J. Food Sci. Technol. 23: 287-293.

BEM, Z. y HECHELMANN, H. (1996). Refrigeración y almacenamiento de la carne refrigerada, procesos microbiológicos. Fleischwirtschaft (Español) 76(1): 33 - 40.

BRIGHTWELL, G., CLEMENS, R., ADAM, K.; URLICH, S., y BOEREMA, J. (2009). Comparison of culture-dependent and independent techniques for characterization of the microflora of peroxyacetic acid treated, vacuum-packaged beef. Food Microbiol. 26: 283-289.

BROWNLIE, L.E. (1966). Effect of some environment factors on psychrotrophic microbacteria. J. of Applied Bacteriol, 29: 447-454.

BUXADÉ, C. (1998). Vacuno de carne: aspectos claves. 2ª edición. Ediciones Mundi - Prensa. Madrid, España. 655 pp.

CAMPBELL, R.J., EGAN, A.F., GRAU, F.H. y SHAY, B.J. (1979). The growth of *Microbacterium thermosphactum* on beef. J. Appl. Bacteriol., 47: 505-509.

CARDENAS, F. y GIANNUZZI, L. (2005). Influencia del envasado en flora cárnica. La Industria Cárnica Latinoamericana 137: 40-45.

CASABURI, A., NASI, A., FERROCINO, I., DI MONACO, R., MAURIELLO, G., VILLANI, F., y ERCOLINI, D. (2011). Spoilage-related activity of *Carnobacterium maltaromaticum* strains in air-stored and vacuum-packed meat. Appl. Environ. Microbiol., 77: 7382-7393.

DE PABLO, B., ASENSIO, M.A., SANZ, B. y ORDOÑEZ, J.A. (1989). The D(--) lactic acid bacteria of meat and meat products. *J. Appl. Bacteriol.*, 66:185-190.

DOYLE, M., BEUCHAT, L. y MONTVILLE, T. (1997). *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. Washington D.C. 768 pp.

EGAN, A.F. (1983). Lactic acid bacteria of meat and meat products. *Antonie van Leeuwenhoek* 49: 327-336.

ERCOLINI, D., RUSSO, F., TORRIERI, E., MASI, P. y VILLIANI, F. (2006). Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 4663-4671.

ERCOLINI, D., RUSSO, F., NASI, A., FERRANTI, P. y VILLIANI, F. (2009). Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential in vitro and in beef. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 1990-2001.

ERCOLINI, D., FERROCINO, I., NASI, A., NDAGIJIMANA, M., VERNOCCHI, P., LA SORIA, A., LAGHI, L., MAURIELLO, G., GUERZONI, M.E., y VILLANI, F. (2011). Monitoring of Microbial Metabolites and Bacterial Diversity in Beef Stored under Different Packaging Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77: 7372–7381.

ESKIN, N.A.M., HENDERSON, H.M. y TOWNSED, A.J. (1971). Microbiological deterioration of proteins and protein foods. En.: *Biochemistry of Foods*. (eds.: Eskin, N.A.M., Henderson, H.M. y Townsed, A.J.). Ed.: Academic Press, New York. pp: 183-217.

EUSTACE, I. J. (1981). Some factors affecting oxygen transmission rates of plastic films for vacuum packaging of meat. *J Food Technol.* 16: 73-80.

FANDIÑO, G., SKELLEY, G.C., HANDLIN, D.L. (1989). Acceptability, shrinkage and microbial growth of vacuum packaged pork comparing intact packages,

leaking packaged and roasts sprayed with sodium hypochlorite. J.Food Prot. 52: 35-40.

FONTANA, C., COCCONCELLI, P.S., y VIGNOLO, G. (2006). Direct molecular approach to monitoring bacterial colonization on vacuum-package beef. Appl. Env. Microbiol. , 72: 5618-5622.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) 2011. <http://www.fao.org>. Último acceso: 02/05/12.

FORREST, J., ABERLE, E., HEDRICK, H., JUDGE, M. y MERKEL, R. (1975). Fundamentos de Ciencia de la Carne. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 364p.

FOURNAUD, J., DEGAS, T., SCHMITT, O., SECHET, J. (1980). Pénétration des bactéries dans la viande. Proceedings of the 26th European Meeting of Meat Research Workers. Colorado Springs, CO. 2: 268–271.

FRANCO, J., FEED, O., BIANCHI, G., GARIBOTTO, G., BALLESTEROS, F., NAN, F., PERCOVICH, M., PIRIZ, M., y BENTANCUR, O. (2008). Parámetros de calidad de carne en cinco músculos de novillos Holando durante la maduración *post-mortem*. Agrociencias, 12: 61-68.

FRITZ, P. y ANTILA, P. (1993). Valor Nutritivo de la Carne. Editorial Acribia Zaragoza, España. 184 p.

GALLO, C. (1997). Efectos del manejo pre y post faenamiento en la carne. III Jornadas de Buiatría. Osorno. Chile. pp 68 - 74.

GALLO, C. (1991). Carnes oscuras, firmes y secas (DFD) y pálidas, blandas y exudativas (PSE). Sus efectos en las carnes envasadas. Informativo sobre carne y Productos Cárneos. 20: 41 - 49.

GARDNER, G.A. (1981). *Brochotrix thermosphacta* (*Microbacterium thermosphactum*) in the spoilage of meats: A review. En: Psychrotrophic

Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity (eds.: Roberts, T.A., Hobbs, G., Christian, J.H.B., y Skovgaard, N.). Ed.: Academic Press, Londres. pp: 139-173.

GILL, C.O. (1983). Meat spoilage and evaluation of the potential storage life of fresh meat. *J. Food Prot.*, 5: 444-452.

GILL, C.O. (1986). The control of microbial spoilage in fresh meats. En: *Advances in Meat Research. Meat and Poultry Microbiology. Vol. 2.* (eds.: Pearson y Dutson, T.R.). Ed.: AVI Publishing Co., Wesport,CT. pp.49-88.

GILL, C. O. y HARRISON, C. L. (1989). The storage life of chilled pork packaged under carbon dioxide. *Meat Sci.*, 26: 313-324.

GILL, C.O. y NEWTON, K.G. (1978). Storage quality of dark, firm, dry meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36: 375-376.

GILL, C.O. y NEWTON, K.G. (1979). Spoilage of vacuum-packaged dark, firm, dry meat at chill temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37: 362-364.

GILL, C.O. y NEWTON, K.G. (1982). The effect of lactic concentration on the growth on meat of Gram negative psychrotrophs from a meat works. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43: 284-288.

GILL, C. O. y PENNEY, N. (1977). Penetration of bacteria into meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 1284–1286.

GRAU, F. H. (1980). Inhibition of the anaerobic growth of *Brochothrix thermosphacta* by lactic acid. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40, 433-436.

GREER, G.C. (1989). Red meats, poultry and fish. En: *Enzymes of Psychrotrophs in Raw Food.* (eds.: R.C. McKellar). Ed.: CRC Press, Boca Raton, Florida. pp: 268-292.

HAYES, P. (1993). *Microbiología e higiene de los alimentos*, 1ª edición .Editorial Acribia. Zaragoza, España. 369 p.

HERNÁNDEZ-MACEDO, M.A., BARANCELLI, G.B., y CONTRERAS-CASTILLO, C.J. (2011). Microbial deterioration of vacuum-packaged chilled beef cuts and techniques for microbiota detection and characterization: A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42: 1-11.

HOFMANN, K. (1988). El pH, una característica de calidad de la carne. *Fleischwirtschaft (Español)* 1: 13 - 18.

HOLLEY, R.A.; GILL, C O. (2005). Usos da embalagem em atmosfera modificada para carnes e produtos cárneos. [www.ital.sp.gov.br/ctc/eventos/terceiro\\_congresso/5.doc](http://www.ital.sp.gov.br/ctc/eventos/terceiro_congresso/5.doc). Último acceso: 02/05/12.

ICMSF (1994). Microorganismos indicadores. En: *Microorganismos de los alimentos. Volumen 1. Técnicas de análisis microbiológico*. Ed. Acribia, Zaragoza, España.

ISO 13722:1996. Meat and meat products – enumeration of *Brochothrix thermosphacta*- Colony-count technique. CD/K/737:2010.

JAY, J.M. (1996). Microorganisms in fresh ground meats: The relative safety of products with low versus high numbers. *Meat Science*, 43: 59-66.

JAY, M. (2000). *Microbiología moderna de los alimentos*, 4ª edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 616 p.

KANDLER, O. y NORBERT, W. (1986). *Genus Lactobacillus*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (eds.: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. y Holt, J.G). Ed.: Williams & Wilkins, Baltimore, pp: 1209-1234.

KATSARAS, K. y PEETZ, P. (1990). Cambios morfológicos en el “dark cutting beef” originados por el tratamiento térmico. *Fleischwirtschaft (Español)* 2: 58-60.

KOUTSOUMANIS, K., STAMATIOU, A., SKANDAMIS, P. y NYCHAS, G. J. E. (2006). Development of a microbial model for the combined effect of temperature and pH on spoilage of ground meat, and validation of the model under dynamic temperature conditions. *App. Env. Microb.* Vol 72: 124-134.

KRAFT, A.A. (1992). Psychrotrophic spoilage bacteria - Meat spoilage. En: *Psychrotrophic bacteria in Food Research and Spoilage.* (ed.: Kraff , A.A.). Ed.: CRC Press, Boca Ratón , Florida. pp: 28-61

LAWRIE, R. (1977). *Ciencia de la Carne.* Editorial Acribia. Zaragoza, España. 419p.

MANTECA, X. (2004). El bienestar animal en el marco de la nueva PAC. [www.edicionestecnicasreunidas.com/produccion/cammay5.htm](http://www.edicionestecnicasreunidas.com/produccion/cammay5.htm). Último acceso: 10/04/12.

MASANA, M., MEICHTRI, L. y RODRIGUEZ, R. (2007). Determinación de la vida útil en cortes bovinos. Mayor calidad por más tiempo. [http://produccionbovina.com.ar/informacion\\_tecnica/carne\\_y\\_subproductos/67-vida\\_util\\_cortes.pdf](http://produccionbovina.com.ar/informacion_tecnica/carne_y_subproductos/67-vida_util_cortes.pdf). Último acceso: 10/04/12.

McMEEKIN, T.A. (1982). *Microbial spoilage of meats.* Applied Sci. Publishers, Londres. pp: 1-40.

METAXOPOULOS, J., MATARAGAS, M. y DROSINOS, E.H. (2002). Microbial interaction in cooked cured meat products under vacuum or modified atmosphere at 4 degrees C. *J. Appl. Microbiol.*, 93: 363-373.

MILLER, A. III, SCALAN, R.A., LEE, J.S. LIBBEY, L.M. y MORGAN, M.E. (1973). Volatile compounds produced in steril fish muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas perolens*. *J. Appl. Microbiol.*, 25: 257-261.

MOSSEL, D.A.A. e INGRAM, M. (1955). The physiology of the microbial spoilage of foods. *J. Appl. Bacteriol.*, 18: 232-268.

NEWTON, K.G., HARRISON, J.C. y SMITH, K. M. (1977). The effect of storage in various gaseous atmospheres on the microflora of lamb chops held at 1°C. *J. Appl. Bacteriol.*, 43:53-60.

NEWTON, K. G., HARRISON, J. C. y WAUTERS, A. M. (1978). Sources of psychrotrophic bacteria on meat at the abattoir. *J. Appl. Bacteriol.* 45: 75–82.

NICOL, D.J., SHAW, M.K. y LEDWARD, D.A. (1970). Hydrogen sulfide production by bacteria and sulfmyoglobin formation in prepacked chilled beef. *J. Appl. Microbiol.*, 19: 937-939.

O'KEEFFE, M. y HOOD, E. (1982). Biochemical factors influencing metamyoglobin formation on beef from muscles of differing colour stability. *Meat Science* 7:209 -228.

OLAOYE, O.A. y ONILUDE, A.A. (2009). A study on isolation of presumptive technologically important microorganisms from Nigerian beef. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*. 3: 75-83.

OLIETE, B., Moreno, T., CARBALLO, J.A., MONSERRAT, L. y SÁNCHEZ, L. (2006). Study of rubia gallega breed veal quality during the ageing time Under vacuum. *Arch. Zootec.* 55 (209): 3-14.

PAGE, J., WULF, D. y SCHWOTZER, T. (2001). A survey of beef muscle color and pH. *Journal of Animal Science* 79: 678 - 687.

PALEARI, M., BERETTA, G., GIGNI, E., PARINI, M., RASI, M., CRIVELLI, G. y BERTOLO, G. (1995). Electroestimulación con muy bajo voltaje y carne vacuna con características DFD. *Flischwirtschaft (Español)* 2: 8 - 9.

PATTERSON, J. T., y GIBBS, P. A. (1978). Sources and properties of some organisms isolated in two abattoirs. *Meat Sci.* 2: 263–273.

PETER, H.A., SNEATH, A. y JONES, D. (1986). *Brochotrix*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 2 (eds: Peter, H.A., Sneath, A. y Jones, D.). Ed.: Williams & Wilkins, Baltimore. pp: 1249-1253.

POTTHAST, K. y HAMN, R. (1976). The biochemistry of DFD meat. *Fleischwirtschaft*. 56:978-982.

RAY, B. (2004). *Fundamental food microbiology*. CRC Press, Boca Raton- FL. 608p.

REUTER, G. (1981). Psychrotrophic lactobacilli in meat products. En: *Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity*. (eds.: Roberts, T.A., Hobbs, G., Christian, J.H.B. y Skovgaard, N.). Ed.: Academic Press, Nueva York. pp: 253-258.

ROSSET, R. (1982). Chilling, Freezing and Thawing. En: *Meat Microbiology* (ed: BROWN). Applied Science Publisher Ltda. England. pp 276 - 277.

SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; DE OLIVEIRA, L.M. y CANAVESI, E. (2001). Carnes, aves, pescados e derivados. Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis. Campinas, SP: CETEA, 151-174.

SARANTÓPOULOS, C. y SOLER, R. (1991). Embalagens com atmosfera modificada/controlada. *Rev Nac Carne*. 209: 32-42.

SCHILLINGER, U. y LÜCKE, F. (1987). Bacterias lácticas en carne envasada al vacío y su influencia sobre la conservabilidad. *Fleischwirtschaft* (Español) 2: 46 - 52.

SCHILLINGER, U. y LÜCKE, F. (1991). El empleo de bacterias ácido lácticas como cultivos protectores en productos cárnicos. *Fleischwirtschaft (Español)* 1: 35 - 40.

SCHÖBITZ, R. (1991). Aspectos que influyen sobre la calidad y el tiempo de vida útil de la carne empacada al vacío. *Informativo sobre carne y Productos Cárneos*. 20: 34 - 40.

SCHÖBITZ, R., DE LA VEGA, J. y TAMAYO, R. (1990). Calidad microbiológica y sensorial de la carne de vacuno envasada al vacío almacenada a diferentes temperaturas. *Fleischwirtschaft (Español)* 2: 31 - 36.

SEIDEMAN, S.C., CROSS., H.R., SMITH. G.C y DURLAND, P.R. (1984). Factors associated with fresh meat color: A review. *Journal of Food Quality*. 6: 211-215.

SENER, F. y SCHERZ, H. (1999). *Tabla de composición de Alimentos*. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 215 p.

SEUB, I. (1991). Valor nutricional de la carne y de los productos cárnicos. *Fleischwirtschaft (Español)* 1: 47 - 50.

SKOVGAARD, N. (1985). *Brochothrix thermosphacta*: comments on its taxonomy, ecology, and isolation. *Int. J. Food Microbiol.*, 2: 71-79.

STACKEBRANDT, E. y JONES, D. (2006). The genus *Brochothrix*. *Prokaryotes* 4: 477 - 491.

STAMER, J.R. (1976). Lactic acid bacteria. En: *Food Microbiology: Public Health and Spoilage Aspects*. (eds.: Defigueiredo, M.P. y Splittstoesser, D.F.). Ed.: AVI Publishing, Westport, CT. pp: 404-426.

SUTHERLAND, J.P., GIBBS, P.A., PATTERSON, J.T. y MURRAY, J.G. (1976). Biochemical changes in vacuum-packaged beef occurring during storage at 0° -2° C. *Journal of Food Technology*, 11: 171-180.

SUTHERLAND, J.P., PATTERSON, J.T. y MURRAY, J.G. (1975). Changes in the microbiology of vacuum-packaged beef. *J. Appl. Bacteriol.*, 39: 227-237.

TALON, R., GRIMONT, P. A. D., GRIMONT, F., GASSER, F y BOEUFGRAS, J. M. (1988). *Brochothrix campestris* sp. *Intl. J. Syst. Bacteriol.* 38: 99–102.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (2010). Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health and Science. Detection, isolation and identification of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM (nonmotile) from meat products. USA. p.1-13.

VENUGOPAL, R., INGHAM, C., McCURDY, A. y JONES, G. (1993). Anaerobic microbiology of fresh beef packaged Under modified atmosphere or vacuum. *Journal of Food Science* 58 (5): 935 - 938.

WEISBURG, W.G., BARNS, S.M., PELLETIER, D.A., y LANE, D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703.

WIRTH, F. (1987). Tecnología para la transformación de carne de calidad anormal. *Fleischwirtschaft (Español)*. 1: 22-28.

WONG, D. (1995). Química de los Alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 475 p.