

TIEMPO DE ALMACENAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN CARNES DE RES PICADA EMPACADAS AL VACÍO

Storage Time and Identification of Lactic Acid Bacteria in Vacuum Packed Ground Beef Meat

Carolina Flores-Rondón¹, Merlis Leal¹, Jorge Ruiz-Ramírez¹, Egar Sánchez², Mireya Moreno³, Gustavo Castro¹ y Yasmína Barboza⁴

¹Unidad de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. ²Unidad de Bioestadística. ³Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. ⁴Laboratorio de Investigación y desarrollo en nutrición, Facultad de Medicina Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. E-mail: carolina.flores@fcv.luz.edu.ve

RESUMEN

El propósito de este trabajo fue evaluar el tiempo de almacenamiento y la calidad microbiológica de carne de res picada empacada al vacío (CREV) y comparar los métodos recuentos en placas tradicional y Petrifilm™ 3M, para la determinación de bacterias ácido lácticas (BAL) presentes en este tipo de carnes. Para tal fin, se utilizaron diez muestras de carne de res procedente del corte paleta obtenido a las 48 h posterior al sacrificio. Estas fueron molidas, empacadas al vacío y almacenadas durante 0; 7; 14 y 21 días a 5°C. En cada tiempo de almacenamientos se determinó el número de BAL, pH, recuento total de aerobios (RTA), coliformes totales (CT) y *Escherichia coli*. El tiempo de empacado afectó el crecimiento de BAL, pH, RTA y CT (P<0,05). Se observó que el número de BAL se incrementó al aumentar el tiempo de empacado, disminuyendo el pH. Las BAL fueron el grupo microbiano dominante en las CREV a partir del día 7. Se observó que la CREV requiere de aproximadamente de 7 días con 10 horas para lograr un nivel de BAL adecuadas para iniciar un proceso de fermentación sin la necesidad de añadir cultivo iniciador a la mezcla cárnica. Se identificaron 125 cepas de BAL, el 76% de los aislados correspondió al grupo BAL heterofermentativas facultativas, seguido por homofermentativas obligadas 12% y heterofermentativas obligadas 8,0%. Las especies dominantes fueron *Lactobacillus curvatus* (28,8%) y *L. sakei* (25,6%). Otros de los aislamientos correspondieron a *L. plantarum* (12%) y *L. paracasei* subsp. *paracasei* (9,6%), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides/dextranicum* (8%). No se encontró diferencias entre los métodos recuentos en placas tradicional y Petrifilm™ 3M

para la determinación de BAL. La utilización de CREV por un tiempo mínimo de 7 días con 10 h es una alternativa viable en la elaboración de productos cárnicos fermentados sin la adición de cultivo iniciador.

Palabra clave: Bacterias ácido lácticas, carnes picada de res, empaque al vacío.

ABSTRACT

Storage time and microbiological quality for vacuum packed ground beef (VPGB) were evaluated, the methods traditional plate counts and Petrifilm™ 3M of determination of lactic acid bacteria (LAB) were compared and subsequently LAB present in meat were identified. Ten sample of beef from the top blade cut, obtained to 48 h after slaughter were used. These samples were grounded, vacuum packed and stored during 0, 7, 14 and 21 days to 5°C. From each storages time, of number of LAB, pH, total aerobics plate count (APC), total coliforms (TC), and *Escherichia coli* were determined. Storage time affected (P< 0.05) number BAL, APC and TC. It was observed that number of LAB increase and pH decreased as storage time was longer. The LAB were the dominant bacterial group in VPGB from day 7. It was determined that VPGB required approximately of 7 days and 10 hours to achieve and adequate level of BAL to initiate a process of meat fermentation without need addition of a commercial starters cultures in meat mixes. It was identify 125 LAB strains, from which 76% of isolated LAB corresponded to the group of facultatively heterofermentative, followed by the obliged homofermentative (12%) and obliged heterofermentative (8%). Dominants species were *Lactobacillus curvatus* (28.8%) and *L. sakei* (25.6%). Other bacterial isolations corresponded to *L. plantarum* (12%) and *L. paracasei*

subsp *paracasei* (9.6%), *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides/dextranicum* (8%). No differences were found between the methods traditional plate counts and Petrifilm™ 3M used for the determination of BAL. Utilization of VPGB by a minimum time of the 7 and 10 h is feasible alternative in the elaboration of fermented meat product without addition of a commercial starters culture.

Key words: Lactic acid milk bacteria, ground beef meat, vacuum packing.

INTRODUCCIÓN

La carne es un medio excelente para mantener el desarrollo bacteriano, gracias a sus propiedades biológicas y composición química, entre las que se distinguen un alto contenido de proteínas, pH ligeramente ácido y una elevada actividad de agua [27]. Es importante mencionar que la carga inicial de bacterias psicrófilas y la dinámica de crecimiento de las mismas son los factores más influyentes en el deterioro de la carne en refrigeración [17, 30].

Con la finalidad de prolongar la vida útil de las carnes frescas, en las últimas décadas se han popularizado los métodos de empacados al vacío y atmósferas modificadas [15]. Bajo estas condiciones de empaque y de refrigeración, la microflora de la carne es usualmente dominada por las bacterias ácido lácticas (BAL), debido a que ejercen un efecto modificador en la microflora de la carne, pasando del predominio de los bacilos Gram negativos putrefactivos, tales como *Pseudomonas* ssp. y microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae*, a los microorganismos Gram positivos como el caso de las BAL [6, 29, 33].

Muchos son los usos de las BAL en la industria cárnica, sus productos metabólicos juegan un papel importante en la preservación de las carnes y productos cárnicos por su acción como agentes bioprotectores [21]. Estas representan el grupo más importante de microorganismos encontrados en los cultivos iniciadores comerciales utilizados en las fermentaciones cárnicas, debido a su contribución en cada uno de los objetivos del proceso de fermentación [23].

Es conocido que los productos fermentados fabricados tradicionalmente, con procesos de maduración natural, presentan características sensoriales más deseables que los elaborados a escala industrial con cultivos iniciadores comerciales. Esto es debido a la composición y actividad metabólica de la flora nativa en la materia prima [18]. También se ha demostrado que los cultivos iniciadores ideales para ser utilizados en la elaboración de productos cárnicos fermentados, son los que provienen del mismo hábitat ya que están especialmente adaptados a estas condiciones [24].

Investigaciones realizadas por Ruiz-Ramírez y col. [46], encontraron que carnes empacadas al vacío y refrigeradas durante catorce días a 5°C, eran adecuadas para ser utilizadas

en la elaboración de un producto cárnico fermentado sin la necesidad de agregar cultivo iniciador, lo que constituye una alternativa interesante a desarrollar por la industria cárnica a nivel nacional, debido a que el empleo de cultivos iniciadores acarrea altos costos de producción en la elaboración de estos tipos de productos cárnicos. Por otra parte, empacar las carnes al vacío y almacenarlas en refrigeración es una práctica utilizada en la industria nacional, debido a la necesidad de ablandar dichas carnes, ya que en su mayoría provienen de animales de más 30 meses de edad [26].

Se debe considerar, que para obtener un adecuado proceso de fermentación de las carnes, las cepas microbianas deben presentar algunas características particulares para su utilización, entre las que se destacan una fermentación láctica homofermentativa, por lo que se hace necesario el aislamiento, identificación y selección de BAL nativas encontradas en la carne. Aunado a esto, se necesita una carga inicial en el orden de 10^6 - 10^7 bacterias por gramo de mezcla para lograr obtener las características organolépticas deseadas en este tipo de productos [34].

La identificación de BAL puede ser realizada por el método tradicional mediante recuento en placas de agar MRS (De Man, Rogosa y Sharpe) [7] y el uso de placas secas rehidratables (Petrifilm™ 3M) [43], teniendo este último método la ventaja de permitir conocer de forma directa las homofermentativas y heterofermentativas; sin embargo, actualmente no existe información disponible que compare el empleo de ambos métodos en muestras cárnicas.

Por lo tanto, se realizó una investigación con los siguientes objetivos:

- Determinar el tiempo de almacenamiento de la carne de res (*Bos taurus-Bos indicus*) empacadas al vacío (CREV), en el cual se producen niveles suficientes de BAL para su utilización en fermentaciones cárnicas.
- Comparar el método de recuento de BAL tradicional con el método de recuento en placas de película secas rehidratable (Petrifilm™ 3M), evaluando su utilidad en la determinación del tipo de fermentación.
- Identificar las especies de BAL presentes en la CREV.
- Analizar la calidad microbiológica de la CREV durante el periodo de almacenamiento bajo refrigeración, mediante la determinación del pH, el recuento de aerobio mesófilo y bacterias coliformes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y preparación de la muestra

La carne de res fue obtenida de 10 canales de novillos provenientes del Matadero el Totumo (MATOCA) y clasificadas con la categoría "A" de acuerdo con lo establecido en el decreto 1896 [46]. Se seleccionó el corte de res denominado

paleta (COVENIN-792-82) [4], obtenido del desposte, 48 horas posterior al sacrificio. Posteriormente la carne fue trasladada en cavas de refrigeración hasta el laboratorio de Ciencia y Tecnología de la Carne, de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia (FCV-LUZ), donde se procedió a la preparación de la muestra.

Las muestras fueron procesadas utilizando un molino marca La Minerva (Di Mario Chiadini & cns, Italia), con disco de 1,5 cm de diámetro previamente esterilizado. La carne molida se empacó al vacío, utilizando un equipo marca KOCH modelo Multivac, tipo 040-132-250215 (KC, EUA) de una sola campana, y fueron almacenadas a temperaturas entre 2 a 5°C. Los análisis microbiológicos respectivos se realizaron los días 0; 7; 14 y 21.

Determinación del número de bacterias ácido lácticas y el tipo de fermentación

Para estas determinaciones, 11 g de la muestra se homogenizaron con 99 mL de caldo MRS (De Man, Rogosa y Sharpe, Himedia, India) [7], a partir del homogenizado se prepararon diluciones de la muestra, utilizando para ello caldo MRS hasta alcanzar la dilución 1×10^7 .

Para la enumeración de BAL se utilizaron dos métodos; el primero consistió en sembrar 1 mL de cada dilución en profundidad y por duplicado en placas de petri, utilizando como medio de cultivo agar MRS. El segundo método consistió en inocular 1 mL de las diluciones antes mencionada, en placas de película seca rehidratables para recuento de aerobios mesófilos (Petri-film™3M). Ambas se incubaron a 37°C por 48 horas en una cámara de Gas-Pack con vela encendida, transcurrido este tiempo se contaron como BAL, las placas que presentaban entre 25 y 250 colonias, hasta su confirmación de que fueran Gram positivas, catalasa negativa y oxidasa negativa [45].

Para la determinación rápida del tipo de fermentación de BAL, se observaron las colonias en las placas de películas secas rehidratables (Petri-film™3M) y se procedió al contaje de colonias café rojizas como BAL homofermentativas y heterofermentativas, diferenciándose estas últimas por la presencia de burbujas de gas asociadas a las colonias.

Determinación del número de aerobios mesófilos, coliformes y *Escherichia coli*

Para la determinación del recuento total de aerobios mesófilos (RTA), coliformes totales (CT) y *Escherichia coli* (*E.coli*) se homogenizaron por 2 minutos 11 g de la muestra con 99 mL de agua peptonada al 0,1% (Difco); a partir del homogenizado se prepararon diluciones seriadas de la muestra, utilizando como diluyente agua peptonada a igual concentración.

La determinación se realizó utilizando el método de placas de películas secas rehidratables Petri-film™ 3M para aerobios mesófilos (COVENIN 3338) [2], coliformes totales y *E. coli*. (COVENIN 3276) [1].

Determinación del pH

La medición del pH fue realizada a los 0; 7; 14; 21 días de almacenamiento con un potenciómetro marca ORION modelo 410A (Orion Research, Boston, EUA), el cual posee un electrodo de la misma marca modelo HI 1131, calibrado con soluciones buffer suministrada por la misma marca comercial, de pH 7,0 y 4,0 a temperatura de 25°C.

Identificación de las especies de bacterias ácido lácticas

Se procedió al aislamiento de cepas en las 10 muestras de carne picada empacada al vacío y almacenada a 5°C, durante 14 días. El tiempo de almacenamiento fue seleccionado en base al estudio previo realizado por Ruiz-Ramírez y col. [46]. Se eligieron al azar el 10% de las colonias morfológicamente diferentes, las cuales fueron repicadas en tubos con caldo MRS para la obtención de cultivos puros, luego se procedió a evaluar la morfología celular, y su correspondencia al grupo de bacterias Gram positivas, catalasa y oxidasa negativa [45].

Verificada la pureza del cultivo, se repicaron en medio sólido utilizando agar MRS y se incubaron a 37°C por 48 horas en una cámara de Gas-Pack con vela encendida, para la subsiguiente tipificación de las BAL *a través del sistema* de identificación API 50CHL (BioMérieux, LAB. Francia), el cual es un sistema estandarizado de ensayos bioquímicos para el estudio del metabolismo de 49 carbohidratos por este grupo microbiano.

Preparación del inóculo e inoculación de la Galería API 50 CH

Con todas las colonias que crecieron en las placas de agar MRS, se preparó una suspensión concentrada del cultivo puro, empleando una ampolla de 2 mL de cloruro de sodio al 0,85% (API suspensión médium BioMérieux), a partir de la cual se realizó una suspensión de turbidez igual al patrón 2 de Mcfarland para la posterior inoculación del API 50 CHL médium (BioMérieux), repartiéndose 40 µL de ésta, sobre los tubos de la galería API 50 CH. Posteriormente, los tubos fueron cubiertos con aceite de parafina e incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas.

Análisis estadístico

Diseño del experimento: Se realizó un diseño experimental totalmente aleatorizado, utilizando como factor fijo el tiempo de almacenamiento (t) en cuatro niveles: t_0 = tiempo inicial, t_1 = siete días, t_2 = 14 días y t_3 = 21 días. A cada uno de estos tiempos se le asignaron al azar 10 paquetes similares de carne de res picada envasada al vacío. Los resultados del experimento fueron analizados utilizando el análisis de la varianza y las comparaciones entre las medias de los tratamientos se efectuaron mediante las pruebas de Tukey, haciendo uso del paquete Statistical Analysis System (SAS) versión 8,01 [50]. La comparación de los métodos de recuento BAL, tradicional y el método petrifil, fue realizado mediante la prueba *t* de student [50].

El modelo que describe el diseño del experimento es:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \quad (1)$$

donde:

y_{ij} = variable dependiente: recuento de BAL, RTA, CT y *Escherichia coli*

μ = media general de las observaciones

τ_i = efecto del i-ésimo tratamiento (tiempo de almacenamiento)

ε_{ij} = error experimental

Para predecir el tiempo promedio de almacenamiento de CREV, necesario para que la concentración de BAL sea considerada un cultivo iniciador para la fermentación, se utilizaron varios modelos de regresión no lineal pertenecientes a la familia de modelos exponenciales, potenciales y de crecimiento incluidos en el software Curve Expert versión 1,37 [28]. El mejor modelo predictivo fue seleccionado según los criterios estadísticos error estándar (σ_x) y coeficiente de determinación (r^2). De acuerdo con esto fue escogido el modelo de Harris:

$$y = \frac{1}{a + bx^c} \quad (2)$$

Con $\sigma_x = 0,476$ y $r^2 = 0,941$

Donde y : es el log ufc/g de BAL

x = es el tiempo

$a = 0,30892131$

$b = -0,13469718$

$c = 0,104527090$

Despejando de la expresión (2) el tiempo x se tiene la siguiente expresión en términos de y , la cual permitirá predecir el tiempo dado los valores de y :

$$x = \sqrt[c]{\frac{1-y(a)}{y(b)}} \quad (3)$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuantificación de bacterias ácido lácticas, tipo de fermentación y niveles de pH

En la TABLA I se muestran los valores promedios de BAL obtenidos por los dos métodos de cuantificación utilizados, conteo directo en placas de agar MRS y conteo en placas de películas secas rehidratable Petrifilm™3M. Los resultados indican que los diferentes métodos no se diferencian significativamente. Por lo tanto se puede inferir que ambos métodos son bastante sensibles en la determinación de BAL. No se encontraron investigaciones en las que utilizaran las placas de

película seca rehidratable Petrifilm™3M como técnica de cuantificación de BAL.

Las medias correspondientes al número de BAL (obtenidas por el método tradicional) y valores de pH en la carne de res durante su almacenamiento en refrigeración se presentan en la TABLA II. Se observó que las BAL crecen significativamente ($P < 0,05$) a medida que se prolonga el tiempo de empacado al vacío. Ordóñez y col. [41] reportaron que, el recuento total de microorganismos viables en carne empacada al vacío aumenta continuamente desde el inicio del período de conservación, estabilizándose la tasa de crecimiento después de 20 días. No obstante, en los valores obtenidos en el presente estudio el número de BAL a los 14 días, no se diferenció estadísticamente de los obtenidos a los 21 días. Resultados similares han sido publicados por Ferrer [13] y Ruiz-Ramírez y col. [46] trabajando con carne de res empacada al vacío y almacenada a 5°C.

En la primera semana de almacenamiento de la CREV, las BAL aumentaron de 3,24 en su condición inicial a 6,95 Log

TABLA I
MEDIAS CORRESPONDIENTES AL NÚMERO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS OBTENIDAS POR DIFERENTES MÉTODOS DE DETERMINACIÓN

Tiempo (días)	n	Método	\bar{x}	s	Valor P
0	10	MRS	3,24	0,62	0,85
	10	PSR	3,29	0,40	
7	10	MRS	6,95	0,13	0,58
	10	PSR	6,81	0,16	
14	10	MRS	7,60	0,16	0,21
	10	PSR	7,23	0,12	
21	10	MRS	8,09	0,11	0,17
	10	PSR	7,86	0,08	

\bar{x} Expresada en Log ufc/g.

MRS = Conteo en placas de agar medio De Man, Ragosa y Sharpe.
PSR = Conteo en película seca rehidratable.

TABLA II
MEDIAS CORRESPONDIENTES AL NÚMERO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS Y pH EN CARNES EMPACADAS AL VACÍO SEGÚN EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

Días	BAL*	pH
0	3,24 ^a	5,66 ^a
7	6,95 ^b	5,37 ^b
14	7,60 ^c	5,26 ^c
21	8,09 ^c	5,24 ^c

*Valores expresado en Log ufc/g

BAL: Bacterias ácido lácticas.

^{a, b, c} Medias marcadas con letras diferentes en una misma columna difieren estadísticamente ($P < 0,05$).

ufc/g, medias diferentes estadísticamente ($P < 0,05$); para la segunda semana se continuó incrementando pero en menor grado, ubicándose en 7,60 Log ufc/g; valor diferente significativamente ($P < 0,05$) del obtenido durante la primera semana, pero no de la media correspondiente a la tercera semana de almacenamiento, la cual fue de 8,09 Log ufc/g.

Por otra parte, se observó que el pH disminuyó gradualmente ($P < 0,05$), desde el inicio del empacado al vacío ($pH_{\text{inicial}} = 5,66$) hasta los 14 días, ubicándose en 5,26 para luego mantenerse estable hasta el final de la prueba. Esto debido probablemente al mayor crecimiento de las BAL en la carne empacada al vacío, lo cual se acompaña de la formación de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico, lo cual causa la consecuente caída del pH [39, 47].

Resultados similares fueron reportados en investigaciones realizadas anteriormente, observándose una disminución gradual del pH, acompañada de un incremento en el número de BAL durante el almacenamiento a 5°C de carne empacada al vacío [12, 30, 37, 40]. La estabilidad del pH posterior a los 14 días de empacado al vacío y almacenamiento a 5°C, puede deberse probablemente a que valores de pH 5,26 pueden inhibir las enzimas glucolíticas, especialmente la fosfofructoquinasa cesando de esta forma la glucólisis [22].

El método de recuento en películas seca rehidratable Petrifilm™3M permitió la identificación y conteo de colonias de BAL homofermentativas y heterofermentativas, de acuerdo a la metodología establecida por el fabricante [43]. Los valores correspondientes se aprecian en la TABLA III. Los resultados señalan que alrededor de un 70% de las BAL correspondieron al grupo homofermentativo y un 30% a las heterofermentativas.

Los resultados encontrados pudieran representar un riesgo de defectos en un producto cárnico fermentado elaborado a partir de CREV sin la adición de un cultivo iniciador. Tal riesgo estaría dado por la proporción de BAL heterofermentativas obligadas en la CREV [31]. Tal como se ha reportado, el crecimiento de BAL heterofermentativa obligadas causan olores desagradables y agujeros a causa de la producción de

CO₂ [23]. Sin embargo, el uso de bacterias heterofermentativas facultativas en los cultivos iniciadores comerciales es amplio y han sido aisladas de productos cárnicos fermentados elaborados a través de maduración natural, sin observarse la presencia de defectos en éstos [20, 21, 23].

Determinación del tiempo de almacenamiento al vacío de la carne de res

En la FIG. 1 se ilustra gráficamente el desarrollo en el tiempo de las bacterias ácido lácticas en carne de res picada empacada al vacío. Las observaciones, diez en total para cada tiempo de almacenamiento a 5°C, se ajustaron mejor al modelo de Harris como fue mencionado con anterioridad en la metodología. El uso de este modelo, permitió predecir el tiempo necesario para alcanzar el número mínimo de bacterias ácido lácticas necesarias para la fermentación de carnes, el cual se señala en la Figura como punto (P).

Si se toma como carga adecuada para iniciar un proceso de fermentación un valor de BAL 10⁷ por gramo en la materia prima, el modelo establece como tiempo óptimo en base al número de BAL 7,4097 días, indicando que el tiempo mínimo de empacado al vacío de carnes de res picada y almacenada a 5°C, que permitiría lograr el crecimiento de BAL suficientes para iniciar un proceso adecuado de fermentación es aproximadamente de 7 días y 10 horas con 19 minutos.

En las investigaciones realizadas por Ruiz-Ramírez y col. [46] se estableció como tiempo óptimo de empacado al vacío de carne de res para tal fin, 14 días basándose exclusivamente en los conteos obtenidos. Los resultados alcanzados a este respecto son alentadores desde el punto de vista económico, debido a que se necesitaría menor tiempo de almacenamiento en refrigeración de las carnes de res para su posterior

**TABLA III
NÚMERO BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS
HETEROFERMENTATIVAS Y HOMOFERMENTATIVAS EN
CARNES EMPACADAS AL VACÍO OBTENIDAS POR EL
MÉTODO DE PELÍCULAS SECAS REHIDRATABLES**

Tiempo días	n	BAL Heterofermentativas (Log ufc/g)	%	BAL Homofermentativas (Log ufc/g)	%
0	10	2,70	22,7	3,23	77,3
7	10	6,49	29,2	6,88	70,8
14	10	7,01	29,4	7,38	70,6
21	10	7,40	23,8	7,90	76,2

BAL= Bacterias ácido lácticas.

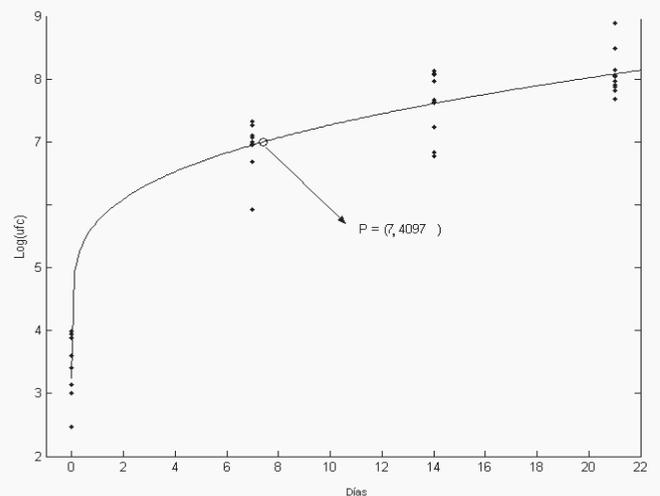


FIGURA 1. CRECIMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN CARNES EMPACADAS AL VACÍO DURANTE 21 DÍAS DE ALMACENAMIENTO A 5°C. EL PUNTO (P) INDICA TIEMPO REQUERIDO PARA OBTENER EL NÚMERO DE BAL PARA INICIAR UNA FERMENTACIÓN CÁRNICA.

utilización en la elaboración de un producto cárnico fermentado a partir de cepas típicas de la región.

Calidad microbiológica

En la TABLA IV se muestran los valores obtenidos en el análisis microbiológico de las carnes de res empacadas al vacío durante su almacenamiento en refrigeración. El recuento total de aerobios mesófilos obtenido para el inicio del ensayo fue de 3,93 Log ufc/g, encontrándose por debajo de las recomendaciones establecidas por COVENIN 2301-85 [3] para las carnes de res molida.

Los resultados indican que el recuento RTA en las CREV (3,93; 4,25; 5,60 y 6,20 Log ufc/g), aumentó con el tiempo de almacenamiento 0; 7; 14 y 21 días respectivamente ($P < 0,05$). Estos hallazgos concuerdan con los obtenidos en las investigaciones realizadas por Gill y Badoni [16], Jones [30] y Fadda y col. [12]. Esto podría deberse entre otras causas, a la permeabilidad del material de empaque al oxígeno ó a una carga inicial alta de este grupo microbiano [44].

Se ha señalado que, conforme aumenta la permeabilidad del oxígeno aumenta proporcionalmente el crecimiento de especies Gram negativas [36]. Sin embargo, los valores RTA obtenidos en el presente ensayo para CREV en el día 21, son similares a los obtenidos por Ferrer [13], en carnes de res sin empacar al vacío en 6 días a 5°C, lo cual demuestra el efecto preservador del empacado al vacío sobre la vida útil de la carne [15, 29, 33].

Por otra parte, se observó que los recuentos de CT aumentaron gradualmente con el tiempo de almacenamiento hasta los 14 días ($P < 0,05$), posterior al cual se mantuvieron estables, esto puede deberse a valores de pH mas bajos observados a los 14 días de almacenamiento a 5°C en las CREV. Varios son los mecanismos de inhibición microbiana que pueden estar presente; sin embargo, uno de los principales descritos es la reducción del pH por la producción de ácidos principalmente ácido láctico [14]. Las CREV no presentaron colonias de *E. coli* a ningún tiempo de almacenamiento. Estos resultados son similares a los mostrados por Gill y Badoni [16] y Minor-Pérez y col. [37].

Caracterización e identificación de bacterias ácido lácticas

Caracterización morfológica: del total de diez empaques al vacío de carne de res se obtuvieron 125 cepas de BAL confirmadas, éstas presentaron una morfología celular variada, la cual fue desde cocos, bacilos rectos alargados, curvos y cortos hasta bacilos cortos y gruesos. La formación en cadenas y en pares fue la más común.

Identificación de bacterias ácido lácticas: en la TABLA V se presenta la distribución porcentual de las BAL identificadas en CREV. Se observó que, después de 2 semanas de almacenamiento a 5°C, la población estuvo compuesta predominantemente por especies heterofermentativas facultativas del

genero *Lactobacillus* 76,0% seguidas por BAL homofermentativas obligadas en 12% y heterofermentativas obligadas 8,0%.

Las especies dominantes fueron *L. curvatus* (28,8%) y *L. fermentum* (25,6%), siendo el primero de los mencionados frecuentemente reportado como flora microbiana psicotrófila en carnes empacadas al vacío [23] y en productos cárnicos fermentados naturalmente [20, 21].

Es importante destacar que, el *L. sakei*, no está incluido en la base de datos del sistema de identificación API50CH y se ha reportado que cepas puras de *L. sakei*, el cual es un microorganismo heterofermentativo facultativo, fue identificado por dicho sistema como *L. fermentum* [52]. Asimismo, investigaciones anteriores señalan que cepas identificadas por el sistema API50CH como *L. fermentum*, fueron identificadas a través de electroforesis en gel, como miembros del grupos *L. sakei/curva-*

TABLA IV
MEDIAS CORRESPONDIENTES AL NÚMERO, AEROBIOS MESÓFILOS, COLIFORMES TOTALES, *Escherichia coli*

Pruebas	Tiempo de almacenamiento (días)				P<
	0	7	14	21	
Replicas	10	10	10	10	0,001
*RTA	3,93 ^a	4,25 ^b	5,60 ^c	6,20 ^d	0,001
*CT	2,54 ^a	4,18 ^b	4,56 ^c	4,60 ^c	0,001
*EC	<1	<1	<1	<1	

* Valores expresado en Log ufc/g. ^{a, b, c, d} Medias con letras distintas en la misma fila difieren significativamente ($P < 0,05$). RTA: recuento total de aerobios. CT: coliformes totales. EC: *Escherichia coli*.

TABLA V
DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE LAS ESPECIES BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DE CARNES DE RES EMPACADA AL VACÍO

Especies*	Número de aislados	Porcentaje
<i>Lactobacillus curvatus</i> ^a	36	28,8
[^] <i>Lactobacillus fermentum</i> ^a	32	25,6
<i>Lactobacillus plantarum</i> ^a	15	12,0
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> ^a	12	9,6
<i>Leuconostoc mesenteriodes</i> subsp <i>mesenteroides/dextranicum</i> ^b	10	8,0
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 1 ^c	8	6,4
<i>Lactobacillus salivarius</i> ^c	7	5,6
Cepas con identificación incierta	5	4,0

*Identificación utilizando el sistema de identificación API 50CHL

[^] La base de datos del sistema API 50CHL no incluyen al *Lactobacillus sakei*. cepas puras de *Lactobacillus sakei*, fueron identificadas por dicho sistema como *Lactobacillus fermentum*.

^a Heterofermentativos facultativos. ^b Heterofermentativos obligados.

^c Homofermentativos obligados.

tus [8]. Esto explica como un alto porcentaje de las cepas aisladas (25,6%), fueron identificadas como *L. fermentum*, el cual no se ha descrito como microorganismo característico en las carnes empacadas al vacío y/o productos cárnicos.

Otras de las cepas de BAL aisladas, fueron identificadas como *L. plantarum* (12%) y *L. paracasei* subsp. *paracasei* (9,6%), éstas son usualmente aisladas en carnes y productos cárnicos, aunque generalmente representan una pequeña proporción del total de la flora láctica aislada en los productos cárnicos [52].

Se ha observado la aplicación de cepas de *L. paracasei* subsp. *paracasei* en la elaboración de productos fermentados para lograr reducir el tiempo de secado en estos embutidos. Esto es debido, a la producción de proteinasas por dicho microorganismo, observando que la actividad proteolítica no afectó la flora microbiana de los cultivos iniciadores ó de la flora nativa de las carnes [19].

Especies como *L. acidophilus* (6,4%) y *L. salivarius* (5,6%) fueron las cepas aisladas en menor cantidad en las carnes de res empacadas al vacío. Por otra parte, del total de los aislados, el 8% fue identificado como *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides/dextranicum*. Similares resultados se han conseguido en otras investigaciones donde, de un total de 70 aislamientos provenientes de carnes de cerdo (*Sus scrofa*) empacada al vacío, 18 fueron identificadas como de *Leuconostoc* sp. y 52 como *L. sakei* [53].

Leuconostoc mesenteroides es descrito como un coco, Gram positivo, microaerofílico, catalasa y oxidasa negativa y heterofermentativo obligado [11], el cual según Egan y col. [9] está asociado a la descomposición de productos cárnicos, principalmente por la formación de limosidad superficial. De igual forma se ha reportado a cepas de *L. sakei* productoras de sulfuros como la principal causa de descomposición de las CREV en refrigeración [10]. Esto posiblemente se deba a características metabólicas de este microorganismo, que le permite la utilización de la arginina como sustrato principal para la producción de ATP cuando las concentraciones de glucosa está en el orden 0,05% (P/P), concentración de glucosa encontrada en la carne fresca [33]. La degradación de éste u otros aminoácidos da origen a la producción de compuestos indeseables como sulfuro y aminas biogénas [35].

No obstante Montel, reporta a *L. sakei* como especie comúnmente utilizada en los cultivos iniciadores comerciales [38], mientras que otros investigadores los reportan como flora natural en los procesos de fermentación natural de varios embutidos fermentados producidos sin defecto [5, 25, 32, 48, 49].

En el presente estudio, *L. sakei*, *L. curvatus*, *L. plantarum* y *L. paracasei* (subsp. *paracasei*) representaron el 76% de la población total de BAL aisladas en las CREV almacenadas por 14 días. Resultados similares se han evidenciado en investigaciones sobre la diversidad de BAL en los embutidos fermentados a través de maduración natural, donde se ha demostrado

que a través de maduración, la flora estuvo dominada principalmente por cepas de BAL heterofermentativas facultativas como es el caso de *L. sakei* y *L. plantarum* [25, 32, 42, 51].

CONCLUSIONES

El tiempo de empacado al vacío de la carne de res, en el cual se logra tener carga de BAL adecuadas para iniciar un proceso de fermentación, es aproximadamente de 7 días con 10 horas.

El método Petrifilm™ 3M para determinar BAL, no se diferenció del método tradicional utilizado para cuantificar este tipo de poblaciones microbianas; sin embargo, este método resulta confiable para diferenciar entre poblaciones de bacterias ácido lácticas homofermentativas de las heterofermentativas.

Las poblaciones de BAL en las CREV durante 14 días, estuvo dominada por bacterias heterofermentativas facultativas, principalmente *L. curvatus*, *L. sakei* y *L. plantarum*. Por lo cual resulta viable, seguro y asequible el uso de CREV en la elaboración de un producto cárnico fermentado por maduración natural.

La calidad microbiológica de CREV cumplió con los límites normales aceptados hasta el día 14 de almacenamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES. ALIMENTOS (COVENIN). Alimentos. Recuento de Coliformes y de *Escherichia coli*. Método en placa con películas secas rehidratables (Petrifilm). COVENIN 3276. 1997.
- [2] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES. ALIMENTOS (COVENIN). Recuento de aerobios. Método de placas con películas secas rehidratables (PETRIFILM). COVENIN 3338. 1997.
- [3] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES. ALIMENTOS (COVENIN). Carne Molida. COVENIN 2301. 1985.
- [4] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES. ALIMENTOS (COVENIN). Carne de bovino. Definición e identificación de las piezas de una canal. (COVENIN 792-82). 1982.
- [5] COPPOLA, R; GIAGNACOVO, B; IORIZZO, M; GRAZIA, L. Characterization of lactobacilli involved in the ripening of soppressata molisata, a typical Southern Italy fermented sausage. **Food Microbiol.** 15:347-353. 1998.
- [6] DAINY, R.; MACKAY, B. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. **J. Appl. Bacteriol.** 73:103S-114S. 1992.

- [7] DE MAN, J.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. Medium for the cultivation of *Lactobacilli*. **J. Appl. Bacteriol.** 23:130-135. 1960.
- [8] DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J.; VAN IMPE, J. Effect of dissolved carbon dioxide and temperature on the growth of *Lactobacillus sake* in modified atmospheres. **Int. J. Food Microbiol.** 41:231-238. 1998.
- [9] EGAN, A. Lactic acid bacteria of meat and meat products. **A. Van. Leeuw.** 49:327-336. 1983.
- [10] EGAN, A.; SHAY, B.; ROGERS, P. Factors affecting the production of hydrogen sulphide by *Lactobacillus sake* L13 growing on vacuum packaged beef. **J. Appl. Bacteriol.** 67:255-262. 1989.
- [11] ELLEN, G. Genus *Lactococcus*. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe, MF, Holt JG. (Eds.) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Vol. 2, Baltimore. William and Wilkins. Pp 1071-1075. 1986.
- [12] FADDA, S.; CHAMBON, C.; CHAMPOMIER-VERGES, M.; TALON, R.; VIGNOLO, G. *Lactobacillus* role during conditioning of refrigerated and vacuum-packaged Argentinean meat. **Meat Sci.** 79:603-610. 2008.
- [13] FERRER, K. Efecto del empaque y descontaminante en la vida útil de las carnes fresca. Trabajo de Grado. División de postgrado Facultad de Ingeniería. Universidad del Zulia. Maracaibo. Venezuela. 65 pp. 2000.
- [14] GUERRERO, I.; TAYLOR, A. Meat surface decontamination using lactic acid from chemical and microbial source. **Lebensm. Wiss. Technol.** 27:201-209. 1994.
- [15] GILL, C. Extending the storage life of raw chilled meats. **Meat Sci.** 43:S99-S109. 1996.
- [16] GILL, C.; BADONI, M. Microbiological and organoleptic qualities of vacuum-packaged ground beef prepared from pasteurized manufacturing beef. **Int. J. Food Microbiol.** 74:111-118. 2002.
- [17] GOULD, W.; ABEE, I. Physiology of food poisoning microorganisms and the major problems in food poisoning control. **Int. J. Food Microbiol.** 28:121-128. 1995.
- [18] GRECO, M.; MAZZETTE, R.; DE SANTIS, E.; CORONA, A.; COSSEDDU, A. Evolution and identification of lactic acid bacteria isolated during the ripening of sardinian sausages. **Meat Sci.** 69:733-739. 2005.
- [19] HAGEN, B.; BERDAGUE, J.; HOLCK, A.; NAES, H.; BLOM, H. Bacterial proteinase reduces maturation time of dry fermented sausages. **J. Food Sci.** 61:1024-1029. 1996.
- [20] HAMMES, W.; HERTEL, C. New developments in meat starter cultures. **Meat Sci.** 49:S125-S138. 1998.
- [21] HAMMES, W.; KNAUF, H. Starters in processing of meat products. **Meat Sci.** 36:155-168. 1994.
- [22] HERBERT, O. Caracteres del tejido muscular. En: **Fenemma, Introducción a la ciencia de los alimentos**. Reverté, S.A.(Ed.). España. Pp 695-718. 1982.
- [23] HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic acid for the biopreservation of meat and products. **Meat Sci.** 49:S139-S150. 1998.
- [24] HUGAS, M.; MONFORT, J. Bacterial starter cultures for meat fermentation. **Food Chem.** 59:547-554. 1997.
- [25] HUGAS, M.; GARRIGA, M.; AYMERICH, T.; MONFORT, J. Biochemical characterization of *Lactobacilli* isolated from dry fermented sausages. **Int. J. Food Microbiol.** 18:107-113. 1993.
- [26] HUERTA, N.; JEREZ, N.; RODAS, A.; MÁRQUEZ, E.; ARISPE, M.; RIVERO, J. Observaciones preliminares sobre el uso de tecnología postmortem para mejorar la calidad de la carne de bovinos venezolanos de diferente condición sexual edad y tipo racial. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** VIII (2):123-132. 1997.
- [27] HUIS, J.; VELD, T. Microbial and bioquímical spoilage of food an overview. **Int. J. Food Microbiol.** 33:1-18. 1996.
- [28] HYAMS, D. Curve Expert Version 1,37. A comprehensive curve fitting package for Windows. 2005.
- [29] JONES, R. Immunization against lactic-acid bacteria as a technique to extend the chilled storage life of vacuum-packed lamb. **Food Agricult. Immunol.** 11:75-81. 1999.
- [30] JONES, R. Observations on the succession dynamics of lactic acid bacteria populations in chill storage. **Int. J. Food Microbiol.** 90:273-282. 2004.
- [31] KANDLER, O.; WEISS, N. Genus *Lactobacillus*. En: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe, MF, Holt JG. (Eds.) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Vol. 2. Baltimore. William and Wilkins 1209-1304 pp. 1986.
- [32] KOSTINEK, M.; SPECHT, I.; EDWARD, V.; PINTO, C.; EGOUNLETY, M.; SOSSA, C.; MBUGUA, S.; DORTU, C.; THONART, P.; TALJAARD, L.; MENGU, M.; FRANZ, C.; HOLZAPFEL, W. Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. **Int. J. Food Microbiol.** 114:342-351. 2007.
- [33] LABADIE, J. Consequences of packaging on bacterial growth meat is an ecological niche. **Meat Sci.** 52:299-305. 1999.
- [34] LARPENT, J. Productos cárnicos fermentados. En: Bourgeois CM, Larpent, JP. **Microbiología Alimentaria**. Vol 2, **Fermentaciones alimentarias** Editorial Acribia (Eds). Zaragoza. España. Pp 271-279. 1995.
- [35] LEISTNER, J.; GREER, G.; STILES, M. Control of beef spoilage by a sulphide-producing *Lactobacillus sake* strain with bacteriocinogenic *Leuconostoc gelidum*

- UAL187 during anaerobic storage at 2°C. **Appl. Environ. Microbiol.** 62:2610–2614. 1996.
- [36] LÜCKE, F. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Sci.** 56:105-115. 2000.
- [37] MINOR-PÉREZ, H.; PONCE, E.; MACIAS, S.; GUERRERO, I. Conservación de la carne fresca de cerdo por fermentación láctica: Efecto sobre el color, la textura y la formación de los ácidos grasos libres. **Rev. Mex. Ing. Química** 1:73-80. 2002.
- [38] MONTEL, M. Fermented meat products. En: Robinson RK, Batt CA, Patel PD. (Eds). **Encyclopedia of Food Microbiology.** Academic Press, San Diego. Pp 744-753. 1999.
- [39] MOLLY, K.; DEMEYER, D.; CIVERA, T.; VERPLAESTE, A. Lipolysis in a Belgian sausage: Relative Importance of endogenous and bacterial enzymes. **Meat Sci.** 43:235-244. 1996.
- [40] NÁPRAVNÍKOVÁ, E.; VORLOVA, L.; MALOTA, L. Changes in Hygienic quality of vacuum packed pork during storage. **Acta Vet. BRNO.** 71:255-262. 2002.
- [41] ORDOÑEZ, J.; CAMBERO, M.; FERNÁNDEZ, L.; GARCÍA, M.; GARCÍA, G.; DE LA HOZ, L.; SELGAS, M. Alimentos de origen animal. En: **Tecnología de los alimentos.** Vol II. Editorial Síntesis S.A. Madrid, España. Pp 230-237. 1998.
- [42] PARENTE, E.; GRIECO, S.; CRUDELE, M. Phenotypic diversity of lactic acid bacteria isolated from fermented sausages produced in Basilicata (Southern Italy). **J. Appl. Microbiol.** 90:943-952. 2001.
- [43] PETRIFILM 3M. Determinación de bacterias ácido lácticas. Guía de interpretación de resultados. 3M productos microbiológicos. 1994.
- [44] RAMSBOTTOM, J. Envasados. En: Price J, Schweiger BS. (Eds). **Ciencia de la carne y de los productos cárnicos.** Acribia, Zaragoza-España. Pp 523-547. 1976.
- [45] REUTER, G. Elective and selective media for lactic acid bacteria. **Int. J. Food Microbiol.** 2:55-58. 1985.
- [46] RUIZ-RAMÍREZ, J.; BARBOZA, Y.; ROMÁN, R.; FERRER, K.; BRÍÑEZ, W.; MÁRQUEZ, E. Utilización de carnes empacadas al vacío en la elaboración de productos cárnicos fermentados. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** XIII (2):75-82. 2003.
- [47] RUST, R. Productos embutidos. En: Price J.; Schweiger BS. (Eds) **Ciencia de la carne y de los productos cárnicos.** Acribia, Zaragoza. España. Pp 415-440. 1994.
- [48] SAMELIS, J.; MAUROGENAKIS, F.; METAXOPOULOS, J. Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. **Int. J. Food Microbiol.** 23:179-196. 1994.
- [49] SAMELIS, J.; METAXOPOULOS, J.; VLASSI, M.; PAPPA, A. Stability and safety of traditional Greek salami. A microbiological ecology study. **Int. J. Food Microbiol.** 44: 69–82. 1998.
- [50] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS INSTITUTE. User's Guide Statistic. 646 pp. Version 8,1. 2000.
- [51] TORRIANI, S.; DELLAGLIO, F.; PALUMMERI, M. Characterization of lactobacilli isolated from Italian sausages. **Ann Microbiol Enzim.** 40:225-233. 1990.
- [52] VERMEIREN, L; DEVLIEGHERE, F; DEBEVERE, J. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. **Int. J. Food Microbiol.** 96:149–164. 2004.
- [53] YOST, C.; NATTRESS, F. The use of multiplex PCR reactions to characterize populations of lactic acid bacteria associated with meat spoilage. **Lett Appl Microbiol.** 31:129-133. 2000.