

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la
Producción**

Estudio del Efecto de la Reducción de la Actividad de Agua, pH y Adición de Ácidos Orgánicos en el Crecimiento de *Escherichia coli* en Filetes de Res Almacenados a Temperatura Ambiente.

TESIS DE GRADO

Previo la obtención del Título de:

INGENIERA DE ALIMENTOS

Presentada por:

Grace Katherine Vásquez Véliz

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2007

A G R A D E C I M I E N T O

A todas las personas que de uno u otro modo colaboraron en la realización del presente trabajo y especialmente a la MSc Fabiola Cornejo Z. Directora de Tesis, por su invaluable ayuda.

DEDICATORIA

MI DIOS

A MIS PADRES

A MI ESPOSO

A MIS HIJOS: GRACE, FABIÄN Y

DANNA

TRIBUNAL DE GRADUACION

Ing, Eduardo Rivadeneira P.
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE

MSc. Fabiola Cornejo Z.
DIRECTOR DE TESIS

MSc.Maria Fernanda Morales R.
VOCAL

Ing. Luís Miranda S.
VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL”.

(Reglamento de Graduación de la ESPOL).

Grace Katherine Vásquez Véliz

INDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	II
INDICE GENERAL.....	IV
ABREVIATURAS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
INDICE DE TABLAS.....	VIII
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1	
1. GENERALIDADES.....	3
1.1 Materia Prima.....	5
1.1.1 Principales Causas de Alteraciones de los filetes de res.....	7
1.2 Tecnologías de Barreras en Alimentos.....	8
1.2.1 Aspectos Básicos.....	9
1.2.2 Aplicaciones.....	13
1.3 Métodos de Preservación Propuestos.....	14
1.3.1 Reducción de Actividad de Agua.....	14
1.3.2 Reducción del pH.....	18
1.3.3 Adición de ácidos orgánicos.....	22

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y METODOS.....	26
2.1 Materia Prima.....	26
2.2 Soluciones Osmóticas Ternarias.....	28
2.3 Ácidos Orgánicos.....	31
2.4 Análisis Sensorial.....	32
2.5 Análisis Físico-Químico.....	34
2.6 Análisis Microbiológico.....	37

CAPÍTULO 3

3. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANALISIS DE RESULTADOS.....	44
3.1 Selección de la concentración de agentes osmóticos, pH y ácidos orgánicos.....	44
3.2 Diseño Experimental.....	51
3.3 Efecto de la reducción de actividad de agua.....	54
3.4 Efecto de la reducción de pH y adición de ácidos orgánicos.....	56
3.5 Efecto Sinérgico de las Barreras Seleccionadas.....	60

CAPITULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	63
--	----

APÉNDICES

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

ERS	Servicio de Investigaciones Económicas
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
E. coli	Escherichia coli
pH	Potencial de Hidrógeno
PSE	Carne exudativa, blanda y pálida
DFD	Carne seca, firme y oscura
°T	Temperatura
Aw	Actividad de agua
Eh	Potencial Redox
Lag	Fase de adaptación de un microorganismo
S.O.	Solución Osmótica
HA	Acido débil
H ⁺	Ión hidrógeno
[H ⁺] [A ⁻]	Concentración de ácido disociado
[HÁ]	Concentración de ácido no disociado
pKa	Constante de disociación del ácido
ICMSF	International Commission on Microbiological Specifications for Foods
PCA	Plate Count Agar (Medio de cultivo)
WFCC	Federación Mundial de Colección de Cultivos
Na ⁺	Ión Sodio
SS / °Brix	Concentración de Sólidos Solubles
HR	Humedad Relativa
HRE	Humedad Relativa de Equilibrio
v/v	Solución volumen / volumen
p/v	Solución peso / volumen
OD	Densidad Óptica
nm	Nanometros
CRA	Capacidad de Retención de Agua
Cl ⁻	Ión Cloro
MNC	Muy Numerosos para Contar
UFC/g	Unidades Formadoras de Colonia por gramo

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 2.1	Escala hedónica verbal de cinco puntos.....33
Figura 2.2	Cell Density.....39
Figura 2.3	Fases del Crecimiento Microbiano.....40
Figura 3.1	Sinopsis de los tratamientos aplicados.....45
Figura 3.2	Influencia de la adición de NaCl en la CRA y dependencia de la misma con el pH.....49
Figura 3.3	Esquema de los pasos seguidos en el diseño del experimento.....53

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1	Composición del Tejido Muscular Magro de los animales de abasto.....6
Tabla 2	Niveles mínimos aproximados de actividad de agua que permiten el crecimiento de los microorganismos bajo condiciones optimas de crecimiento..... 16
Tabla 3	Niveles mínimos aproximados de pH que permiten el crecimiento de los microorganismos bajo condiciones optimas de crecimiento.....19
Tabla 4	Actividad de Agua de Soluciones Osmóticas Ternaria empleadas.....31
Tabla 5	Valores de Concentración y pH de SO.....32
Tabla 6.	Análisis Físico – Químicos.....35
Tabla 7	Valores de Actividad de Agua en Equilibrio de Soluciones Saturadas de diferentes Sales a 7 ± 2 °C.....36
Tabla 8	Análisis Microbiológicos.....38
Tabla 9	Preparación de la escala MacFarland.....41
Tabla 10	Estimación de la Población Bacteriana en UFC ml ⁻¹ a partir de las absorbancia..... 42
Tabla 11	Parámetros físico-químicos de los tratamientos seleccionados, mediante evaluación sensorial.....51
Tabla 12	Factores y niveles estudiados en la selección de agente osmótico.....52
Tabla 13	Factores y niveles estudiados en la selección de la concentración de ácidos orgánicos.....52
Tabla 14	Efecto de Actividad de Agua en el Crecimiento de E. coli a Temperatura de 30 ± 2 °C.....54
Tabla 15	Parámetros físico-químicos evaluados en la carne de res, luego de la acidificación.....57
Tabla 16	Efecto de la concentración de ácido no disociado en la inhibición del Escherichia coli a 30 ± 2 °C.....59
Tabla 17	Efecto sinérgico de los tratamientos aplicados en la inhibición del Escherichia coli a 30 ± 2 °C.....61

RESUMEN

El presente trabajo tiene por objeto estudiar el efecto que produce la alteración de algunos factores de crecimiento microbiano, como: la actividad de agua (a_w), el potencial de hidrógeno (pH) y adición de agentes antimicrobianos en el crecimiento del *Escherichia coli*. Con el fin de establecer métodos de preservación que retarden en gran medida el proceso de deterioro de un alimento altamente perecible, como lo es carne de res. La intensidad de cada una de las barreras a aplicar, debe ser tal, que no modifique drásticamente la calidad sensorial y nutritiva del alimento.

Durante el tratamiento se redujo la actividad de agua y el pH. Los agentes osmóticos utilizados fueron: cloruro de sodio y sacarosa en concentraciones de 40, 50 y 60 % y; en la acidificación del medio se emplearon ácidos orgánicos como: ácido láctico, ácido acético y ácido cítrico en diferentes concentraciones. El método utilizado para la aplicación de los tratamientos fue de Impregnación y deshidratación por inmersión (PIDR) en solución osmótica. Paralelamente, se elaboró la isoterma de desorción del producto fresco por el método isopiéstico. Posteriormente, se determinó como el mejor tratamiento aquel que no cambiara drásticamente las características sensoriales del producto y que a la vez produzca una reducción importante

de la actividad de agua y un pH con un adecuado porcentaje de ácido no disociado en el alimento. Para ello, se realizaron los análisis físico-químicos y sensoriales correspondientes. Finalmente, se inoculó los filetes de res tratados con cepas de *Escherichia coli* y se almacenaron a temperatura ambiente de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por veinticuatro horas. Durante el almacenamiento se realizaron pruebas microbiológicas para determinar el grado de supervivencia del microorganismo inoculado. Todos los análisis se realizaron por duplicado y réplica. En el análisis estadístico se utilizaron los promedios de las determinaciones realizadas.

En términos generales se demostró que la aplicación inteligente de mínimos procesos de preservación redujeron los recuentos de *E.coli* en tres ciclos log. Estableciéndose, como el mejor tratamiento el 40C02 con actividad de agua de 0,93; pH de 5,18 y; un porcentaje de ácido no disociado de 0,0006. Obteniéndose un producto seguro, nutritivo y de sabor agradable con poca energía e inversión.

Los resultados de este estudio servirán en el desarrollo de una metodología de preservación para alimentos altamente perecibles aplicable a sectores sociales que no cuentan con un sistema de conservación a bajas temperaturas debido a la falta de suministro de energía eléctrica.

INTRODUCCIÓN

Se ha logrado establecer que *Escherichia coli* productor de verotoxina (VTEC) tiene considerable importancia. Este microorganismo ha sido objeto de numerosas investigaciones, pero se conoce relativamente poco de su ecología y de su incidencia en la cadena de procesado de alimentos. Se han implicado numerosos alimentos como vectores del microorganismo, pero el consumo de productos picados de vacuno, en especial las hamburguesas, ha emergido como un factor de riesgo importante. En Reino Unido, durante 1993, se demostró que el 17 % de los productos de vacuno estaban contaminados con VTEC. El serotipo O157, comúnmente asociado con enfermedades en humanos, no fue detectado, pero los serotipos dominantes presentes se asociaron con la enfermedad. Se estima que este microorganismo es responsable de aproximadamente 73.000 casos de enfermedades en humanos y de 61 muertes por año en los Estados Unidos.

Es así, que se han diseñado una amplia variedad de métodos de descontaminación de la carne, los cuales, podemos situar en tres categorías: inactivación o eliminación física, inactivación o eliminación química y radiación ionizante. En países Latinoamericanos como Colombia, Chile, Argentina, Brasil, Costa Rica, Cuba, México, Nicaragua, Puerto Rico y

Uruguay, por medio del programa de CYTED (Ciencia y Tecnología para el Desarrollo) de Latinoamérica, han investigado sobre la aplicación de la tecnología de obstáculos (barreras) en productos autóctonos de estas regiones como frutas, vegetales y productos de panificación. Cerca de 260 productos microbiológicamente estables a temperatura ambiente han sido desarrollados. Esta tecnología se basa en producir pequeños cambios, como disminución de actividad de agua, acidificación, potencial redox, uso de preservantes, etc.; los cuales combinados adecuadamente incrementan el tiempo de vida útil del alimento, de tal manera que se obtiene un producto seguro, nutritivo, de sabor agradable con poca energía e inversión.

En el Ecuador según el Censo de Población y Vivienda del 2001 elaborado por el INEC, el porcentaje de viviendas sin energía eléctrica en áreas rurales fue de 20,92% y en áreas urbanas 6,7%. Consecuentemente, este segmento de la población debe consumir los alimentos altamente perecibles de forma inmediata. Analizando todos estos antecedentes, el presente estudio busca analizar el efecto combinado de tratamientos de preservación como: reducción de actividad de agua, disminución de pH, adición de ácidos orgánicos, a fin de inhibir y/o excluir el desarrollo de microorganismos patógenos específicamente *E. coli* y demás cepas causantes de alteración en la carne de res. Con el propósito de prolongar el tiempo de vida útil de este producto.

CAPITULO 1

1. GENERALIDADES

Los animales productores de carne se consideran reservorios importantes de microorganismos patógenos. Estos patógenos de origen animal entran constantemente en la cadena alimenticia del ser humano, donde las contaminaciones cruzadas durante el proceso pueden conducir a un elevado nivel de contaminación de la carne fresca y los productos cárnicos. Esto a su vez contribuye a la aparición de enfermedades en el hombre. Un ejemplo es *Escherichia coli* O157:H7, que se considera que es fundamentalmente de origen bovino y su presencia en los alimentos es

un indicador de contaminación fecal directa e indirecta. También, nos indica la posibles presencia de patógenos entéricos.

Estudios realizados por el Servicio de Investigaciones Económica (ERS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) estima que el costo debido a infecciones agudas y crónicas en humanos asociadas a microorganismos patógenos transmisibles en alimentos, incluido *Escherichia coli* O157:H7, asciende a 37,1 billones de dólares americanos por año (Buzby & Roberts. 1997). Se estima que este microorganismo es responsable de aproximadamente 73.000 casos de enfermedades en humanos y 61 muertes por año en los Estados Unidos (Mead et al, 1999).

Por lo tanto, un alto conteo de *Escherichia coli* y Coliformes fecales en alimentos es un indicador de falta de higiene en la manipulación, procesamiento y almacenamiento inadecuado.

Se han diseñado una amplia variedad de métodos de descontaminación de la carne, los cuales, podemos situar en tres categorías: inactivación o eliminación física, inactivación o eliminación química y radiación ionizante. Actualmente, existe una cantidad de datos que describen el crecimiento de *E.coli* bajo diferentes condiciones ambientales que han servido para

desarrollar modelos cinéticos de crecimiento (Presser et al, 1997; Salter et al, 1998). Estos modelos fueron construidos usando una variedad de cepas, sustratos y parámetros ambientales pero no consideran el efecto sinérgico o combinado de temperatura, actividad de agua, pH y concentración de ácidos orgánicos, etc.

El presente estudio busca determinar el efecto combinado de tratamientos de preservación, a fin de inhibir y/o excluir el desarrollo de microorganismos patógenos específicamente *E. coli*, en un sustrato complejo como la carne y bajo condiciones normales de almacenamiento.

1.1. Materia Prima: Carne de res

La carne se considera como un alimento altamente proteico, ya que el 95% del contenido total de nitrógeno es proteína y el 5 % restante lo constituye pequeños péptidos, aminoácidos y otros compuestos.

La composición química de la carne magra es relativamente constante en una amplia diversidad de animales (Tabla 1). Las variaciones más importantes se presentan en el contenido de lípidos, lo que se refleja en los distintos grados de veteado. Debido a su alto contenido de agua y de su valor de actividad de agua, la carne se clasifica entre los alimentos de alta humedad y fácilmente

putrescibles. Es por ello, que factores como el pH junto con la actividad de agua son importantes en la conservabilidad de este alimento.

TABLA 1
COMPOSICIÓN DEL TEJIDO MUSCULAR MAGRO DE LOS ANIMALES DE ABASTO

ESPECIES	AGUA	PROTEINA	LIPIDOS	CENIZAS
Vacuno	70 -73	20 - 22	4 - 8	1.0
Pollo	73.7	20 - 23	4.7	1.0
Cordero	73	20	5 - 6	1.4
Cerdo	68 – 70	19 – 20	9 -11	1.4

FUENTE: GRAN, 1968.

Existen tres determinantes de la calidad de la carne a nivel del consumidor: color, jugosidad y dureza (terneza). El sabor es habitualmente importante solo en sentido negativo cuando aparecen sabores desagradables. El color es el factor más importante con respecto a la selección inicial. En las carnes rojas un color rojo brillante asociado con un alto contenido de oximioglobina es un determinante positivo de la calidad, mientras el contenido de metamioglobina es un determinante negativo. También se reconocen dos defectos específicos: carne exudativa, blanda y pálida (PSE) y carne seca, firme y oscura (corte oscuro, DFD), debidos ambos a un pH postmortem anormal (10).

1.1.1 Principales Causas de Alteraciones de los filetes de Res.

La principal causa de alteración de las carnes frescas y procesadas (troceada, fileteada y/o molida) es de origen microbiano. El cuchillo es usualmente el vehículo que contamina y propaga los microorganismos de una res a otra, o de distintas partes de una misma res contribuyendo en el incremento de la carga microbiana inicial.

La presencia de un limo pegajoso, indica contaminación por aerobios cercana a 10^6 gérmenes/gramo (*Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Acromobacter*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Micrococcus*) (20). Adicionalmente, se producen cambios de color debido a reacciones enzimáticas, o bacterianas unas originadas por el *Bacillus hemosulfurans* productor del color verde brillante y otras de decoloración parda o gris por formación de metamioglobina.

Si las carnes frescas no han sido cuidadosamente manipuladas y conservadas pueden ocasionar casos de toxiinfección alimentaria, originadas por *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* o *Escherichia coli*, debido a una deficiente cocción (4, 22).

1.2 Tecnologías de Barreras en Alimentos.

La seguridad microbiológica, así como, la calidad nutricional de muchos alimentos es basada en la aplicación de factores preservantes combinados llamados *barreras* (Leistner, 1995).

En el pasado se ha aplicado estas barreras en forma empírica sin estudiar su efecto individual y combinado. Actualmente, lo que busca la tecnología de barreras es analizar el efecto de estas barreras en la fisiología y comportamiento de los microorganismos, para así, combinarlas inteligentemente, sin alterar drásticamente la integridad del alimento y su calidad.

Las barreras más importantes usadas en la preservación de alimentos son Temperatura ($^{\circ}\text{T}$), actividad de agua (a_w), Potencial de Hidrógeno (eh), Potencial Redox (Eh), concentración de ácidos orgánicos (acidez), antimicrobianos y microorganismos competitivos (Leistner, 2000). Consecuentemente, para cada alimento, existe un conjunto de barreras inherentes que le proporciona estabilidad y seguridad. En cualquier caso, estas barreras, deben ser diseñadas de modo que no permita que la carga microbiana inicial aumente durante el almacenamiento del producto.

1.2.1 Aspectos Básicos

La preservación de los alimentos, según tecnología de barreras, consiste en situar a los microorganismos en un ambiente hostil, con el fin de inhibir su crecimiento, disminuir su supervivencia o causar su lisis.

Cuando un microorganismo se encuentra en un medio hostil, cambia su fisiología, desarrollando mecanismos de auto protección denominados homeostáticos. Estos mecanismos, requieren que el organismo centre toda su energía metabólica en adaptarse y sobrevivir, dando lugar a reacciones de estrés que terminan por destruir al microorganismo (21).

Homeostasis

Es el estado de equilibrio dinámico o el conjunto de mecanismos por los que todos los microorganismos tienden a alcanzar una estabilidad en las propiedades de su medio interno, con el fin de mantener su crecimiento y asegurar la supervivencia.

El efecto barrera busca alterar la homeostasis de los microorganismos, en forma temporal o permanente, de manera

que se mantenga la fase lag o en el mejor de los casos muera el microorganismo.

La mayor parte de los mecanismos homeostáticos son activos e implican desgaste de energía en la síntesis, reparación, incremento del transporte celular, etc., para contener el estrés impuesto por el ambiente extremo.

Metabolismo Exhaustivo o Cansancio Metabólico.

Este fenómeno se da como consecuencia del incremento de la demanda de energía para mantener la homeostasis interna del microorganismo, bajo condiciones de estrés (Steege et Al, 1995). Este desgaste o cansancio metabólico ocasiona la muerte del microorganismo, generando una especie de auto esterilización del alimento.

Consecuentemente, el cansancio metabólico de un microorganismo vegetativo ocurre más rápidamente si la estabilidad del alimento es cercana al límite de crecimiento del microorganismo. Según algunos estudios se ha demostrado que el cansancio metabólico es acelerado si más barreras están presentes (Leistner, 1994b; Alzamora et Al, 1995;

Tapia de Daza, 1996). También, se ha demostrado que las temperaturas bajas no siempre son beneficiosas para la seguridad y estabilidad microbiológica de los alimentos, ya que aumenta la supervivencia (a excepción de los microorganismos psicrófilos) al reducir su actividad metabólica.

Reacciones Antiestrés.

Adicionalmente, cuando un microorganismo se encuentra en un medio inhóspito, este, reacciona sintetizando proteínas antiestrés (stress shock proteins), las cuales hacen al microorganismo tolerante al medio. Por lo tanto, la presencia de estas proteínas antiestrés constituye un problema en la aplicación de tecnología de barreras, ya que le restan estabilidad microbiológica y la seguridad a los productos desarrollados.

Sin embargo, la activación de los genes para la síntesis de estas proteínas antiestrés será más difícil si diferentes tipos de estrés son recibidos al mismo tiempo. Consecuentemente, la exposición simultánea a diferentes tipos de estrés requerirá mayor consumo de energía en la síntesis más proteínas antiestrés, lo que causaría que el microorganismo se canse

metabólicamente. Por lo tanto, la preservación multitarget de los alimentos puede ser la clave para evitar la síntesis de estas proteínas.

Preservación Multitarget de los Alimentos.

Este concepto fue introducido por Leistner (1995) e implica que la acción de las barreras no es solo individual, sino que es también sinérgico (Apéndice A).

El efecto sinérgico se alcanza cuando cada barrera actúa al mismo tiempo sobre diferentes objetivos dentro de la célula bacteriana; obteniéndose así, alteración de la homeostasis del microorganismo en diferentes aspectos. Si esto ocurre, la reparación de la homeostasis así como, la síntesis de las proteínas antiestrés se hace más dificultoso.

Por lo tanto, la aplicación simultánea de diferentes barreras, seleccionadas inteligentemente, en la preservación de un alimento en particular debe conllevar a una óptima estabilidad, seguridad y calidad sensorial del alimento.

1.2.2 Aplicaciones

En la actualidad, la demanda de producto mínimamente procesados y sin aditivos ha ganado fuerza en la mayor parte de los países industrializados. La aplicación de tecnología de barreras es una buena opción, ya que permite obtener alimentos estables y seguros; debido a que las barreras que se utilizan son de baja intensidad que conservan las propiedades nutritivas y organolépticas del alimento. Por ejemplo, la tecnología de barreras se ha utilizado en productos crudos para eliminar la carga microbiana inicial aplicando baños de inmersión o de spray con agua caliente o vapor, soluciones de químicos, etc. También se ha utilizado en la conservación de productos destinados a la alimentación del ejército, alimentos funcionales, alimentos congelados, etc. (8, 12, 18, 26).

Por otro lado, los alimentos mínimamente procesados y estables a temperatura ambiente son los más apetecidos, debido a que requieren menos energía y son de bajo costo. El método de preservación más utilizado es la reducción de a_w que por lo general se combina con una reducción del pH. Adicionalmente, el uso de agentes antimicrobianos naturales presentes en especias y hierbas reemplaza a los preservantes

químicos. De esta manera, productos como alimentos de humedad intermedia y de alta humedad han sido desarrollados (21).

1.3 Métodos de Preservación Propuestos

Para el estudio de la aplicación de tecnología de barreras, en filetes de res almacenados a temperatura ambiente, se han tomado en consideración las siguientes barreras: reducción de a_w , para lo cual se empleara sal y azúcar como agentes osmóticos en diferentes concentraciones; reducción del pH (acidificación) y adición de ácidos orgánicos, mediante uso de ácidos cítrico, ácido acético y ácido láctico.

Estas barreras fueron seleccionadas por su compatibilidad con las características del producto y por ser relativamente económicas y de fácil aplicación. Adicionalmente, el alimento es mínimamente procesado, logrando obtener un alimento similar al fresco, estable y con mejores características microbiológicas, sensoriales y nutritivas.

1.3.1 Reducción de Actividad de Agua

La actividad de agua (a_w) es un índice que refleja la disponibilidad del agua para reacciones de deterioro

bioquímicas (oxidación de lípidos, reacciones enzimáticas, reacción de Maillard) y microbiológicas en un alimento. Mientras más cercano sea el valor de actividad de agua a 1, más disponibilidad de agua existe.

En alimentos proteicos, como la carne, la principal causa de deterioro se debe a su alta actividad de agua, que es mayor o igual a 0,98. En este rango de actividad de agua, crecen sin dificultad todos los microorganismos causantes de toxiinfecciones alimentarias y los que habitualmente dan lugar a alteraciones de la calidad (Tabla 2).

Por lo tanto, una reducción de éste parámetro, en combinación con otros agentes de conservación, puede llegar a retardar en gran medida el proceso de deterioro de un alimento. Esta reducción, se puede lograr aumentando la concentración de soluto en la fase acuosa del alimento mediante la extracción del agua o mediante la adición de solutos. La deshidratación osmótica es un método de conservación basado en la reducción de la actividad de agua.

Deshidratación Osmótica.

Durante la deshidratación osmótica ocurren dos fenómenos de transferencia de masa: agua se transfiere desde el producto hacia la solución osmótica (S.O) y solutos se transfieren desde la solución osmótica hacia el producto. El gradiente de potencial químico que participa como fuerza impulsora de los dos flujos de transferencia de masa es la diferencia de actividad de agua entre un lado y otro de la membrana semipermeable que forma el tejido animal.

TABLA 2

Niveles mínimos aproximados de actividad de agua que permiten el crecimiento de los microorganismos bajo condiciones óptimas de crecimiento (De Troller y Chritian, 1978).

Microorganismo	Actividad de Agua (a_w)
Campylobacter	0.98
Pseudomonas fluorescens	0.97
Aeromonas hydrophila	0.97
Clostridium botulinum tipo E	0.96
Clostridium perfringens	0.96
Bacterias ácido lácticas	0.95
Salmonella sp.	0.95
Escherichia coli	0.95
Vibrio parahaemolyticus	0.95
Bacillus cereus	0.93
Listeria monocytogenes	0.92
Staphylococcus aureus	0.91
Microbacterium sp.	0.94

Efecto de la reducción de a_w sobre los microorganismos.

Al momento de delinear las barreras a aplicarse en un alimento, es de gran importancia el conocimiento de la actividad de agua mínima a la que los microorganismos pueden crecer debido a que, una reducción substancial de la actividad de agua puede llegar a tener un efecto marcado sobre la composición de la flora microbiana en un alimento. Consecuentemente, los microorganismos que en un principio eran de interés en la alteración de un alimento pueden dejar de serlo, al reducir la a_w , constituyéndose una nueva flora microbiana de importancia en el deterioro del alimento.

La mayoría de las bacterias crece bien a a_w entre 0,98 y 0,95; a valores de actividad de agua más bajos la velocidad de crecimiento y la masa celular disminuyen a la vez que la duración de la fase de latencia aumenta hasta llegar al infinito, es decir, cesa el crecimiento (14,15).

La mayoría de los valores de a_w son obtenidos bajo condiciones (p.e.: temperatura, pH, Eh, nutrientes) óptimas para el crecimiento. Cuando éstas condiciones y otros factores ambientales se desvían del punto óptimo para un microorganismo determinado, disminuye su resistencia frente a

actividades de agua reducidas, aumentando la a_w mínima que permite el crecimiento.

1.3.2 Reducción del pH

El pH de un alimento es uno de los principales factores que determinan la supervivencia y el crecimiento de los microorganismos durante el procesado, el almacenaje y la distribución (6,14). La acidificación es una técnica milenaria que se emplea en la conservación de los alimentos, y consiste en la reducción del pH con la finalidad de inhibir y en el mejor de los casos, eliminar la proliferación particularmente de microorganismos ácido-sensibles (Tabla 3).

Las sustancias ácidas de los alimentos son casi siempre ácidos débiles (HA). En solución una parte de este ácido se encuentra disociada y otra no. Consecuentemente, los microorganismos se ven afectados tanto por el nivel de iones H^+ libres (o sea, el pH, fracción disociada) como por la concentración de ácido débil no disociado, la que a su vez depende del pH (Apéndice B).

TABLA 3

Niveles mínimos aproximados de pH que permiten el crecimiento de los microorganismos bajo condiciones óptimas de crecimiento (Russell, N.J., Gould G., 1991).

Microorganismo	Potencial de Hidrógeno (pH)
Bacillus cereus	5
Clostridium perfringens	5
Campylobacter	4.9
Vibrio parahaemolyticus	4.8
Clostridium botulinum	4.6
Escherichia coli	4.4
Pseudomonas fluorescens	4.4
Listeria monocytogenes	4.3
Staphylococcus aureus	4.0
Salmonella sp.	3.8
Bacterias ácido lácticas	3.0 – 3.5

Los aniones de algunos ácidos débiles (p.e.: ácido acético o láctico) son metabolizados dentro de la célula bacteriana liberando H^+ que acidifican el interior de la célula hasta alcanzar niveles inhibitorios. Otros aniones no son metabolizados y por lo tanto no acidifican el interior de la célula.

Efecto de la reducción del pH sobre los microorganismos.

La capacidad que tienen muchos microorganismos de crecer dentro de amplios rangos de pH, supone, que la célula

bacteriana posee mecanismos que permiten estabilizar su pH interno. No obstante, se ha comprobado que el pH interior puede verse considerablemente afectado por el pH del medio exterior.

Existe dos tipos de conservadores ácidos: los ácido fuertes (ácido clorhídrico y ácido fosfórico), que proveen de altas concentraciones de protones, reduciendo el pH drásticamente hasta niveles inaceptables en alimentos y los ácidos débiles lipofílicos, cuya forma no disociada se difunde a través de la membrana celular, acidificando el interior de la célula e inhibiendo el transporte de nutrientes.

Algunos ácidos débiles, como el láctico y cítrico originan aniones (citrato y lactato) que la célula es capaz de transportar y cuya presencia no inhibe el metabolismo energético. Otros, como el ácido acético o el fórmico, son eficaces conservadores debido a no solo son buenos conductores de protones, sino que, además pueden dar lugar a concentraciones intracelulares de sus aniones que ejercen acción inhibitoria.

Se ha demostrado experimentalmente, bajo condiciones optimas de crecimiento en laboratorio, que la acción del pH

puede verse influenciada por la presencia de otros factores – tales como presencia de especies competidoras, tensión de oxígeno, o temperaturas poco favorables, actividad de agua reducida, etc. – que reducen la amplitud del pH al que es posible el crecimiento (23).

Por lo tanto, una adecuada disminución del pH potenciada con una adecuada reducción de a_w , puede tener efecto sobre el tiempo de latencia y la velocidad de crecimiento celular máxima de los microorganismos. Para el caso del *Staphylococcus aureus* el pH mínimo de crecimiento, en un medio de laboratorio, es 4,5 si la concentración de NaCl esta entre 8 y 10% y 6 en presencia de 16% de NaCl; a concentraciones superiores a 10%, no se sintetiza toxina a ningún pH (Riemann y col., 1972).

La tolerancia de los microorganismos al pH también se ve también influenciada por el ácido empleado en la acidificación. Es así, que para obtener una reducción del 90% en la velocidad de crecimiento del *Streptococcus aureus*, es necesario bajar el pH a 5,2 si se utiliza ácido acético, hasta 4,9 si se emplea ácido láctico y 4,7 si se acidifica con ácido cítrico. Dentro de un

rango de pH de 6,7 a 4,0, el ácido de mayor poder inhibidor para *Salmonella typhimurium* resulto ser el cítrico seguido del ácido láctico cuyo efecto fue intermedio. En el caso del *Clostridium botulinum*, en alimentos moderadamente ácidos, a diferentes pHs, el ácido acético resulta más eficaz que el cítrico como inhibidor del crecimiento (Townsend y col., 1954).

En definitiva, los efectos que el pH puede ejercer sobre el crecimiento microbiano en los alimentos, pueden verse influidos por otros factores ambientales, cuyos efectos son a su vez modificados por el pH.

1.3.3 Adición de ácidos orgánicos.

Los ácidos orgánicos y sus esteres se hallan muy difundidos en la naturaleza y constituyen un medio muy valioso para retrasar o evitar la alteración proteolítica de muchos alimentos perecederos.

Al considerar su utilización como preservante en alimentos, es conveniente recordar que la actividad antimicrobiana de estos compuestos suele ser superior a medida que se alarga la longitud de su cadena molecular. Los ácidos cítrico y acético

son los más utilizados en alimentos debido a su excelente solubilidad, sabor y baja toxicidad.

En condiciones de equilibrio, la relación entre la concentración del ácido disociado $[H^+][A^-]$ y la del ácido no disociado $[HA]$ se expresa mediante una constante (pKa) llamada *constante de disociación*. Conociendo la concentración del ácido (acidez titulable), el pH y el pKa se puede calcular la cantidad de ácido no disociado presente en la solución.

En definitiva, la acción bacteriostática de los ácidos débiles depende básicamente de la concentración de moléculas *no disociada* (Apéndice C).

Efecto de los ácidos orgánicos sobre los microorganismos.

La actividad antimicrobiana de un ácido orgánico o su éster está dada por su concentración no disociada (Ingram y col., 1956; Macris, 1975)). Estos ácidos no disociados actúan modificando la permeabilidad de la membrana celular produciendo un desacople en el transporte de sustratos y en la fosforilación oxidativa del sistema transportador de electrones (alteración del equilibrio iónico); dando lugar a la acidificación

del contenido citoplasmático que termina por inhibir o matar al microorganismo.

Según estudios, se ha determinado que concentraciones de ácidos orgánicos superiores al 1 % o, cuando se acidifica hasta $\text{pHs} \leq 4,0$ resultan muy eficaces frente a diversos microorganismos, incluidos virus (Dakin, 1957).

El empleo de ácidos orgánicos es factible con la de otros conservadores o sistemas de conservación; ciertamente muchas combinaciones poseen efecto sinérgico. Por ejemplo, estos muestran mayor eficacia como inhibidores microbianos a medida que disminuye la temperatura de almacenamiento y mayor como microbicidas a medida que la temperatura aumenta (Goepfert y Hicks, 1969; Park y Marth, 1972). Otras combinaciones las constituyen el ácido láctico con el acético (Rubin, 1978); los benzoatos con el cloruro de sodio y la sacarosa (Chichester y Tanner, 1972). El uso de tales combinaciones precisa el empleo de concentraciones inferiores de cada uno de los componentes para obtener el mismo efecto protector.

Sin embargo, algunos microorganismos crecen en presencia de elevadas concentraciones de ácidos, debido a que desarrollan mecanismos homeostáticos que le permiten subsistir en ambientes extremos. Este efecto se logra contrarrestar si se aplican de manera simultánea otras barreras.

Por ello, es importante al momento de seleccionar un ácido considerar el número de microorganismos, el tipo y la resistencia relativa de la microflora que se pretende inhibir o destruir, así como su habilidad para crecer en condiciones normales de uso y almacenamiento. También es preciso conocer las regulaciones sanitarias para el uso de aditivos permitidos (FAO/WHO, 1973).

CAPITULO 2

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Materia Prima

Carne de res: En este estudio se utilizó como muestra carne de res fresca y fileteada, la cual fue adquirida en el supermercado de carnes "La Española". Se escogió este establecimiento porque cuenta con instalaciones idóneas para el procesamiento y comercialización de carnes. El corte empleado fue pulpa del tipo PSE (exudativa, blanda y pálida) y con un ligero veteado (Apéndice D).

Las muestras fueron transportadas en cajas térmicas (hielera) con sustituto de hielo (blue ice), para evitar cambios de temperatura que puedan afectar la integridad de las mismas, hasta los laboratorios de Ingeniería de Alimentos – ESPOL, donde fueron cortados en trozos con dimensiones de aproximadamente 14 X 8 X 0,3 cm. y con un peso promedio de 40 ± 2 gr., se colocaron individualmente en fundas plásticas (Ziploc). Una parte de las muestra se almacenaron a 7 ± 2 °C para ser analizadas posteriormente. Las muestras restantes se utilizaron en el desarrollo de los tratamientos.

Cultivo Bacteriano: La cepa de *Escherichia coli* utilizada en este estudio se obtuvieron inicialmente del suelo (15, 16, 17). El aislamiento e identificación de este patógeno, se realizó según los métodos descritos por la ICMSF (Apéndice E). Para la conservación * de las cepas de *E. coli* se realizaron siembras en tubo inclinado por estrías en agar PCA y se almacenaron a 5 ± 2 °C.

* Variadas técnicas se encuentran disponibles para la conservación de microorganismos y para eso debe considerarse lo recomendado por la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (WFCC, siglas en inglés), en sus guías generales.

Se realizaron replicaciones cada 72 horas a fin de mantener la viabilidad, pureza y estabilidad genética del cultivo. Todos los procedimientos descritos anteriormente se realizaron por replica bajo condiciones asépticas.

2.2. Soluciones Osmóticas Ternarias

Para la elaboración de las soluciones ternarias se utilizaron como agentes osmóticos: cloruro de sodio (sal de mesa) y sacarosa (azúcar blanca) en solución acuosa. Tanto el cloruro de sodio como la sacarosa fueron adquiridas en un supermercado local.

Se escogió el cloruro de sodio por ser un excelente depresor de la actividad de agua, debido a su fácil impregnación en el tejido animal y por el efecto inhibitorio sobre los microorganismos del ión Na^+ . Por otro lado, la sacarosa otorgará brillo al producto al mismo tiempo que reducirá la aspereza asociada con el salado. Estas cualidades combinadas permiten obtener mejores resultados en el proceso de deshidratación osmótica. Adicionalmente, ambos agentes osmóticos son compatibles sensorialmente con el alimento.

Se emplearon soluciones ternarias de 40, 50 y 60 °Brix. La relación

cloruro de sodio / sacarosa utilizadas fueron 1:1; 1,5:1; 2:1 en por ciento de solución osmótica (SO) respectivamente. La proporción de SO / producto fue de 4/1, con tiempos de inmersión de 2,5; 5; 10; 15; y 20 minutos.

Los valores de actividad de agua, de los filetes de res con y sin tratamiento, se calcularon mediante la ecuación de Grover (2.1) (19):

$$\text{HRE (\%)} = 104 - 10E^0 + 0.45 (E^0)^2 \quad (2.1)$$

$$E^0 = \sum(E_i / m_i)$$

Donde:

E_i : es el valor según tablas del ingrediente i, (Apéndice F)

m_i : es el contenido de humedad del ingrediente en gramos de agua por gramo de ingrediente.

Para la aplicación de la ecuación de Grover fue necesario conocer la composición del sistema. Esta composición se determinó mediante un balance de componentes (Apéndice G).

Para el cálculo de la actividad de agua de las soluciones osmóticas se aplicó la ecuación de Ross (2.2) (19) (Apéndice H).

$$A_f = A_i * A_{H1} * A_{H2} * A_{H3} * \dots * A_{Hi} \quad (2.2)$$

Donde:

A_f = La actividad de agua final solución.

A_i = La actividad de agua antes de añadir los solutos i.

A_{Hi} = La actividad de agua del soluto i disuelto en toda el agua

La actividad de agua de los solutos se calculo, según la ley de Raoult' s (2.3).

$$A_w = \gamma * (N_{H2O} / N_{H2O} + N_{SOLUTO}) \quad (2.3)$$

Donde:

γ = coeficiente de actividad de agua. (ClNa= 2; Sucrosa= 1)

N_{H2O} = Número de moles del disolvente

N_{SOLUTO} = Número de moles del soluto i.

En la tabla 4 se indican los valores de A_w de las soluciones osmóticas empleadas

Tabla 4

Actividad de Agua de Soluciones Osmóticas Ternaria empleadas.

Solución	Concentración de S.S. (°Brix)	Aw
A	40	0.788
B	50	0.713
C	60	0.617

FUENTE: Elaborado por Grace Vásquez V.

2.3. Ácidos Orgánicos

Los ácidos orgánicos utilizados en este estudio fueron: ácido acético (vinagre), ácido cítrico y ácido láctico. Se seleccionaron estos ácidos por su eficacia relativa en la inhibición de microorganismos, además de ser altamente solubles en el agua, de agradable sabor, baja toxicidad y compatibles sensorialmente con el alimento.

Se empleo vinagre comercial (ácido acético al 4% \approx) en concentraciones del 2, 4, 6 y 8% (v/v) ; ácido cítrico qp (Merck) en concentraciones del 0.2, 1, 2 y 3 % (p/V) y ácido láctico qp (Merck) al 0.5, 1 y 2% (v/v). Estos ácidos fueron incorporados al filete por inmersión durante 10 minutos. Los valores de pH de cada una de las soluciones se indican en la tabla 5.

Tabla 5

Valores de Concentración y pH de Soluciones Utilizadas.

Solución	Concentración (%)	pH*
Acido Acético	2	3.24
	4	3.07
	6	3.00
	8	2.94
Acido Cítrico	0.2	2.61
	1	2.26
	2	2.09
	3	2.02
Acido Láctico	0.5	2.35
	1	2.30
	2	2.19

*Valores de pH medidos a temperatura de $25 \pm 0,1$ °C.

FUENTE: Elaborado por Grace Vásquez V.

2.4. Análisis sensorial

La evaluación sensorial es una disciplina científica utilizada para medir, analizar e interpretar respuestas a las propiedades de los alimentos por medio de los sentidos (vista, olfato, sabor, tacto y oído) (Hollander, 1998). Según Muñoz y Chambers (1993), la información hedónica que se obtiene es una herramienta valiosa porque provee información más en concordancia con la de los consumidores, que son los únicos que pueden indicar con veracidad el grado de aceptación o rechazo de un producto (2).

Para llevar a cabo esta prueba se trabajó con un panel de degustación conformado por cinco jueces entrenados que debían describir verbalmente la sensación que les produce la muestra. Los panelistas debían probar cinco muestras de carne, todas con diferentes tratamientos, y describir cuánto les gusta o les disgusta. A cada panelista se le entregó un cuestionario con las instrucciones de uso correspondientes (Apéndice I).

Para esta prueba sensorial se utilizó una escala hedónica de 5 puntos (Fig.2.1), donde 1 representó Me disgusta mucho y 5 representó Me gusta mucho. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza. Para propósitos de este estudio se utilizó un límite de confianza de 95%.

ESCALA HEDONICA DE CINCO PUNTOS	
Descripción	Valor
Me gusta mucho	+2
Me gusta ligeramente	+1
Ni me gusta ni me disgusta	0
Me disgusta ligeramente	-1
Me disgusta mucho	-2

Fig.2.1 Escala hedónica verbal de cinco puntos (Anzaldúa-Morales y col., 1983).

2.5. Análisis Físico- Químico

Los análisis físico-químicos practicados a las soluciones ternarias, materia prima (filetes de res sin tratamiento) y a los filetes de res con tratamiento se indican en la tabla 6.

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado de acuerdo a los métodos descritos por la "Association of Official Analytical Chemists" (AOAC, 1990) con algunas modificaciones. En el análisis estadístico se utilizaron los promedios de las determinaciones realizadas.

Determinación de Actividad de agua (Método Gravimétrico).

La relación entre la composición de un alimento y su actividad de agua es muy compleja. Para conocer estas relaciones se determinaron los valores de a_w del alimento a diferentes concentraciones de agua en equilibrio, los que se representó gráficamente con el fin de obtener las isothermas de sorción de agua (Wolf, Spiess & Jung, 1985).

La isoterma de desorción fue determinada gravimétricamente, por exposición de la carne a diferentes atmósferas de humedades

relativas (A_w) conocidas y controladas por medio de diferentes sales inorgánicas (8,19).

TABLA 6
Análisis Físico – Químicos

PRODUCTO	ANALISIS
Solución Osmótica Ternaria	Sólidos Solubles
	pH
	Cloruros
Filetes de res sin tratamiento	Humedad
	Actividad de agua
	pH
	Acidez
Filetes de res con tratamiento (deshidratados y acidificados)	Humedad
	Actividad de Agua
	Acidez
	pH
	Cloruros

FUENTE: Elaborado por Grace Vásquez V.

El equipo de sorción consistió en un container hermético de PVC, en total once, que contenían cada uno diferentes soluciones saturadas de sales en equilibrio con actividad de agua del rango de 0,1 a 0,98 (Tabla 7).

Todas las isotermas se realizaron a $7\pm 2^{\circ}\text{C}$ a fin de evitar el deterioro de la muestra durante el análisis. Las muestras fueron pesadas sistemáticamente cada 72 horas hasta peso constante (Apéndice J).

TABLA 7

Valores de Actividad de Agua en Equilibrio de Soluciones Saturadas de diferentes Sales a $7\pm 2^{\circ}\text{C}$

	Aw
Hidróxido de Sodio	0.095 \pm 0.28
Acetato de Potasio	0.234 \pm 0.53
Cloruro de Magnesio	0.335 \pm 0.24
Nitrato de Magnesio	0.573 \pm 0.33
Ioduro de Potasio	0.721 \pm 0.31
Cloruro de Sodio	0.757 \pm 0.22
Nitrato de Sodio	0.775 \pm 0.45
Cloruro de Amonio	0.805 \pm 0.96
Sulfato de Amonio	0.821 \pm 0.51
Cloruro de Potasio	0.868 \pm 0.39
Sulfato de Potasio	0.982 \pm 0.76

Fuente: Adaptación de Greenspan (1977).

2.6. Análisis Microbiológico

Las pruebas microbiológicas realizadas tanto a la materia prima como a los filetes con tratamiento se describen en la tabla 8.

En el aislamiento e identificación de la *Escherichia coli* se siguieron los protocolos recomendados por ICMSF (17,24). La técnica empleada fue del Número Mas Probable (NMP) y posterior aislamiento en agar EMB (Merck); en la identificación se realizó tinción Gram y las pruebas bioquímicas respectivas para este tipo de microorganismo.

A fin de cuantificar la carga microbiana inicial de *Escherichia coli* a inocular se empleo el estándar MacFarland, como una herramienta válida en la estimación de poblaciones bacterianas (Carpenter, 1969; Koneman et al., 1987; Gerhardt et al., 1994) (3).

Para la determinación de Coliformes de origen fecal: *E. coli* tanto en los filetes sin y con tratamientos se empleo Petrifilms *E.coli*™ (medio fluorogénico de 3M basado en β -glucuronidasa). Se optó por este método por la facilidad, rapidez y confiabilidad de los resultados (9,11).

Todas las determinaciones descritas se efectuaron por duplicado, paralelamente se realizaron blancos a fin de comprobar la idoneidad de los medios de cultivo y de las condiciones de trabajo empleadas.

TABLA 8

Análisis Microbiológicos

	ANALISIS	METODO
Filetes de res sin tratamiento	Recuento de Coliformes Totales Recuento de Coliformes Fecales: E. coli	Petrifilms 3M
Escherichia coli	Aislamiento	NMP EMB Agar
	Identificación	Tinción Gram Pruebas Bioquímicas: Indol, Rojo de metilo, Voges-Proskauer y Citrato Simmons
	Inoculación	Escala MacFarland OD600 Recuento: Petrifilms 3M
Filetes de res con tratamiento e inoculados	Recuento de Coliformes Totales Recuento de Coliformes Fecales: E coli	Petrifilms 3M

FUENTE: Elaborado por Grace Vásquez V.

Medición de la Densidad Celular (OD): La densidad celular de los cultivos de *Escherichia coli* empleados se midieron en un Cell Density, modelo CO 8000, WPA - Biowave, USA (Fig.2.2). Este equipo permite medir las velocidades de crecimiento de todo tipo de célula bacteriana en suspensión a 600 nm bajo diferentes condiciones de temperatura ($^{\circ}\text{T} = 5$ a 35 $^{\circ}\text{C}$) y Humedad Relativa (HR=50 a 80%) (Apéndice K) (28).



Fig. 2.2 Cell Density

Las etapas de crecimiento de un cultivo bacteriano necesitan ser monitoreadas para asegurarnos que se cosechen las células en el punto óptimo de mayor densidad de células vivas. Este punto se

corresponde hacia el final de la fase logarítmica (Fig.2.3). Por lo tanto la densidad óptica (OD) del cultivo bacteriano indica cuando se haya alcanzado este punto.

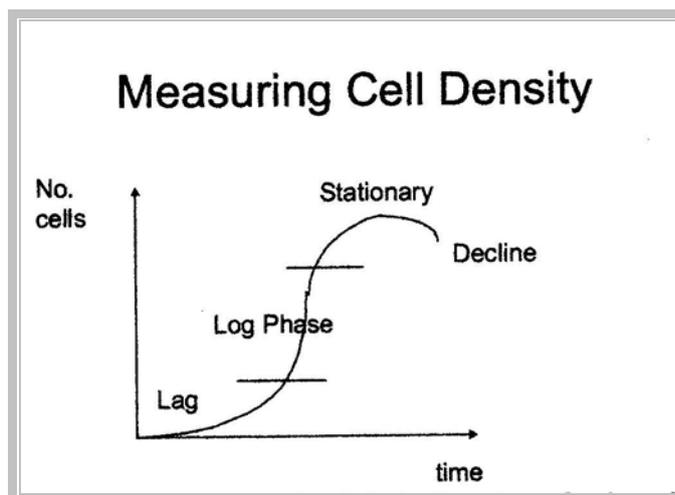


Fig. 2.3 Fases del Crecimiento Microbiano.

Preparación de la Escala MacFarland

Se prepararon cinco patrones de turbidez de la escala de MacFarland, con cloruro de bario y ácido sulfúrico al 1% (Tabla 9).

Cada patrón de turbidez representó una concentración bacteriana, expresada en un número aproximado de bacterias viables $\times 10^8 \text{ ml}^{-1}$ (Lennette et al., 1980; Li et al., 1993). La densidad óptica de los

cinco patrones de la escala de MacFarland se determino a 600 nm, usando tres replicas para cada patrón de turbidez.

TABLA 9

Preparación de la escala MacFarland.

Patrón N°	Cloruro de Bario 1 % (ml)	Acido Sulfúrico 1% (ml)	Densidad Óptica (600 nm)
1	0.1	9.9	0.51
2	0.2	9.8	0.85
3	0.3	9.7	1.09
4	0.4	9.6	1.32
5	0.5	9.5	1.43

FUENTE: Elaborado por Grace Vásquez V.

Para validar la escala de MacFarland se correlacionaron las absorbancia del estándar con la de los cultivos de *E.coli*, realizando recuento poblacional mediante la siembra en placas de *E.coli* Petrifilms 3M (Tabla 10). Todos los análisis se realizaron por replica. En el análisis estadístico se utilizaron los promedios de las determinaciones realizadas.

Preparación e Inoculación de cepas de Eschericha coli.

Cinco tubos con cepas de Eschericha coli fueron preparados y usados para la inoculación. Los aislados de Eschericha coli se

sembraron en agua de peptona estéril al 0,1 % (Merck) y se incubaron a 37°C por 4-6 horas (tiempo en el cual se establece la fase logarítmica, OD 600 nm \approx 0,5).

TABLA 10

Estimación de la Población Bacteriana en UFC ml⁻¹ a partir de las absorbancia.

POBLACION BACTERIANA EN UFC ml⁻¹		
Tiempo (horas)	Cepa E. coli	
	Placa Petrifilms 3M	Cell Density OD 600 nm
	Población	Absorbancia
0	1.06 x 10 ⁸	0.51
2	3 x 10 ⁸	0.85
4	17.71 x 10 ⁹	1.09
8	34.30 x 10 ⁹	1.32

FUENTE: Elaborado por Grace Vásquez V.

La inoculación de los filetes tratados se realizó por inmersión durante cinco minutos en un caldo de cultivo de E.coli (OD=0,50), y se almacenaron en fundas estériles a 30 °C por 24 horas. Se realizaron recuentos de E.coli (Petrifilms, 3M) para t = 0, 2, 4 y 8 horas. Todos los tratamientos se realizaron por replica y duplicado, además se

realizaron en paralelo un blanco (muestra con tratamiento y sin inocular) y un testigo (muestra sin tratamiento y sin inocular).

A fin de evitar, algún tipo de contaminación cruzada que pueda afectar en el resultado de los ensayos se procedió a desinfectar todos los utensilios empleados con agua clorinada con 5 -10 ppm de cloro residual (13).

CAPITULO 3

3. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANALISIS DE RESULTADOS.

3.1 Selección de las concentraciones de agentes osmóticos, pH y ácidos orgánicos.

La selección de las concentraciones de agentes osmóticos y ácidos orgánicos se realizó por medio de un análisis sensorial en el que se determinó el grado de satisfacción (gusto o disgusto) que produce la muestra. El panel estuvo conformado por cinco jueces entrenados. Los atributos evaluados fueron: sabor, color y textura. En la figura 3.1 se describen esquemáticamente los tratamientos estudiados.

SOLUCION OSMOTICA TERNARIA DE:

CLORURO DE SODIO / SACAROSA: 40 °Brix (1:1) (1,5:1) (2:1)
50 °Brix (1:1) (1,5:1) (2:1)
60 °Brix (1:1) (1,5:1) (2:1)

Tiempo de inmersión: 2,5; 5; 10; 15 y 20 min.

RESULTADO:

Solución 40 °Brix (1:1)
Tiempo de inmersión 10 min.

ACIDIFICACION:

AC. CÍTRICO: 0.2 - 1 - 2 - 3 % (P/V)

AC. ACÉTICO: 2 - 4 - 6 - 8 % (V/V)

AC. LÁCTICO: 0.5 - 1 - 1,5 - 2 % (V/V)

Solución osmótica 40 °Brix (1:1)
+
Ac. Cítrico: 0,2 y 2 %
Ac. Acético: 2 y 4 %
Ac. Láctico: 0.5 y 1 %

Tiempo de inmersión 10 min.

Fig. 3.1 SINOPSIS DE LOS TRATAMIENTOS APLICADOS

FUENTE: Elaborado por Grace Vásquez V.

De las soluciones osmóticas ternarias estudiadas se determinó, con ($P < 0.01$), que concentraciones del 40, 50 y 60 °Brix con proporciones de cloruro de sodio / sacarosa de (1.5:1); (2:1) y tiempos de inmersión superiores a 2,5 minutos resultaron indeseables sensorialmente, debido al predominio del sabor salado.

Por el contrario, los tratamientos en los que se empleó soluciones osmóticas de 40 y 50 °Brix con proporción de NaCl / Sacarosa de (1:1), y tiempos de inmersión de 2,5 a 20 minutos y, de 2,5 a 5 minutos, respectivamente, no presentaron entre sí diferencias significativas en las puntuaciones obtenidas en la evaluación sensorial, resultando ser aceptables para los panelistas.

Además, se determinó que con la solución osmótica de 40° Brix (1:1) y $t = 10$ minutos, se obtuvo una reducción del contenido de agua desde 75% ($A_w \approx 0,999$) hasta 68% ($A_w \approx 0,93$) en la carne. Lográndose, valores de actividad de agua por debajo del mínimo permisible ($A_w = 0,95$) para el desarrollo de E.coli.

Como beneficio adicional del tratamiento osmótico se obtuvo un brillo en el producto que mejoró notablemente su apariencia (color) respecto del original. Esto se debió a que la inmersión en solución

osmótica proporciona condiciones reductoras que minimizan la formación de metamioglobina (8, 22, 27).

Basándose en el análisis anteriormente descrito, se escogió como el tratamiento idóneo para la reducción de la actividad de agua, la solución osmótica ternaria de 40° Brix (1:1) con un tiempo de inmersión de 10 minutos, debido a que se obtuvo una reducción de la actividad de agua suficiente para inhibir el crecimiento de *E. coli*, sin modificar, notablemente las características sensoriales del alimento.

Tomando como referencia el tiempo de inmersión del experimento anterior ($t = 10$ min.), se procedió a estudiar el efecto del pH y concentración de ácidos orgánicos utilizados, sobre los atributos sensoriales del filete de res; comprobándose con ($P < 0.01$) que la puntuación sensorial decrecía linealmente con la reducción en el pH.

Este desmerecimiento en la puntuación se atribuyó principalmente a los cambios en las propiedades físicas de las proteínas que conllevaron a un endurecimiento de la textura acompañado de un pardeamiento no enzimático (reacción de Maillard), donde el

colágeno y las hemoproteínas parecieron ser los más afectados post-cocción.

Lo antepuesto se fundamenta en el efecto que tiene el pH sobre la capacidad de retención de agua (CRA)* en carnes tratadas con cloruro sódico. Si el pH es mayor que 5 la CRA se mejora notablemente y si el pH es menor de 5 la CRA disminuye al añadir cloruro sódico (10, 22).

Esto se debe a que el ión Cl^- es mucho más activo que el Na^+ y capaz de neutralizar las cargas positivas del músculo a pH menor que 5. A pH mayor que 5 el músculo está cargado negativamente, por lo que el ión Cl^- resulta inactivo (Fig.3.2). De este hecho experimental, dependen propiedades sensoriales de la carne como: color, ternura y jugosidad.

El término CRA se define como la propiedad de una proteína cárnica para retener el agua propia, cuando se somete a un proceso tecnológico. Coincidiendo la mínima CRA a pH 5. Esta cualidad es importante ya que determina dos parámetros económicos: la pérdida de peso en los productos transformados y la calidad de los productos obtenidos

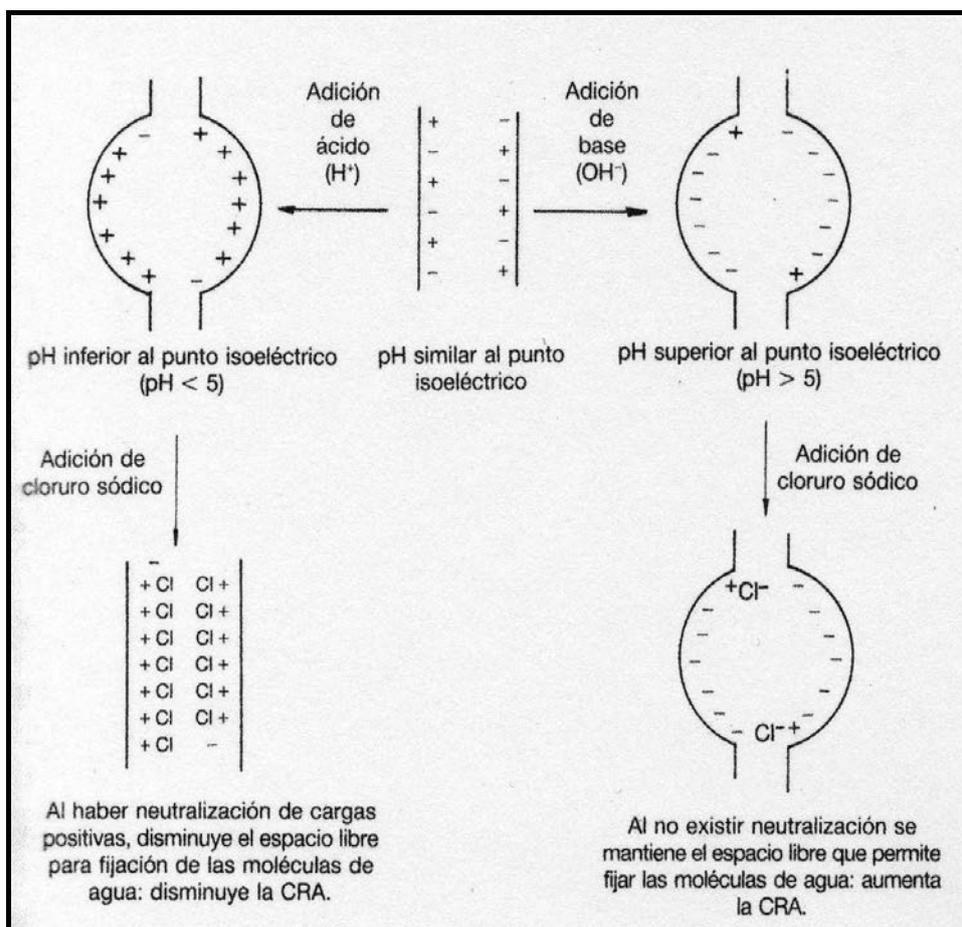


Fig.3.2 Influencia de la adición de NaCl en la CRA y dependencia de la misma con el pH. (López de la Torre, 2001)

Además, se observó que la adición de cloruro de sodio no produjo variación significativa del pH, aunque si tuvo efecto en el punto isoeléctrico de la proteína cárnica, lo cual mejoró su poder de retención de agua. Sin embargo, este efecto decreció paralelamente con el pH.

Por otro lado, concentraciones de ácido cítrico superiores al 1% ocasionaron decoloración y un ligero sabor ácido en el producto. En cuanto a la ternura y jugosidad, estas decrecieron linealmente con el aumento en la concentración del ácido. Resultando el tratamiento con 0,2 % de ácido cítrico el más aceptable.

Respecto al ácido láctico, si bien es cierto tiene magnificas cualidades como conservante natural, su aplicación en productos cárnicos crudos fue poco satisfactoria sensorialmente, ya que resaltó el sabor salado, además de que oscureció notablemente el color de los filetes de res. Se recomienda utilizar como máximo un 0,5 % en solución acuosa.

En cuanto al uso de ácido acético se estableció que concentraciones superiores al 4% resultaron desagradables para los panelistas. La principal razón se atribuyó a la pérdida de jugosidad y ternura (textura reseca) y a un color levemente parduzco post-cocción.

En definitiva, la desnaturalización y pérdida de la capacidad de retención del agua, que se observó en los tratamientos, es menos intensa en muestras de carne con un valor de pH próximo al punto isoeléctrico de las proteínas que a un valor más bajo.

A continuación en la tabla 11 se indican los resultados obtenidos en los análisis físico-químicos realizados a los tratamientos seleccionados (Apéndice L).

TABLA 11

Parámetros físico-químicos de los tratamientos seleccionados, mediante evaluación sensorial.

TRATAMIENTOS	Humedad (%)	Aw	pH	Acidez (%)	NaCl (%)
Blanco	74.74	1	5.30	0	0
4000	68.28	0.92	5.23	0	7.42
40C02	68.22	0.93	5.18	0.17	5.80
40C2	66.07	-	4.75	0.40	-
40L05	68.33	0.93	5.21	0.38	6.13
40L1	66.44	-	4.89	0.68	-
40AC2	67.54	0.94	5.70	0.21	5.22
40AC4	67.96	0.95	5.49	0.48	4.50

FUENTE: Elaborado por Grace Vásquez V.

3.2 Diseño experimental

Para el caso de la selección de la solución ternaria a emplear se aplicó un diseño experimental $3^2 \times 5^1$. Los factores y niveles estudiados se detallan en la tabla 12.

En la selección de las concentraciones de agentes acidulantes se empleó un diseño experimental de $3^1 \times 4^1$. Los factores y niveles estudiados se detallan en la tabla 13.

TABLA 12

Factores y niveles estudiados en la selección de solución osmótica.

FACTORES			
N I V E L E S	CONCENTRACION (° Brix)	PROPORCION (CLNa : Sucrosa)	Tiempo inmersión (minutos)
	40	(1:1)	2.5
	50	(1,5:1)	5
	60	(2:1)	10
	-	-	15
	-	-	20

FUENTE: Elaborado por Grace Vásquez V.

TABLA 13

Factores y niveles estudiados en la selección de la concentración de ácidos orgánicos.

FACTORES					
N I V E L E S	TIPO DE ACIDO	CONCENTRACION (%)			
	Cítrico	0.2	1	2	3
	Acético	2	4	6	8
	Láctico	0.5	1	1.5	2

FUENTE: Elaborado por Grace Vásquez V.

A continuación se indican los pasos seguidos en el desarrollo del experimento (Figura 3.3).

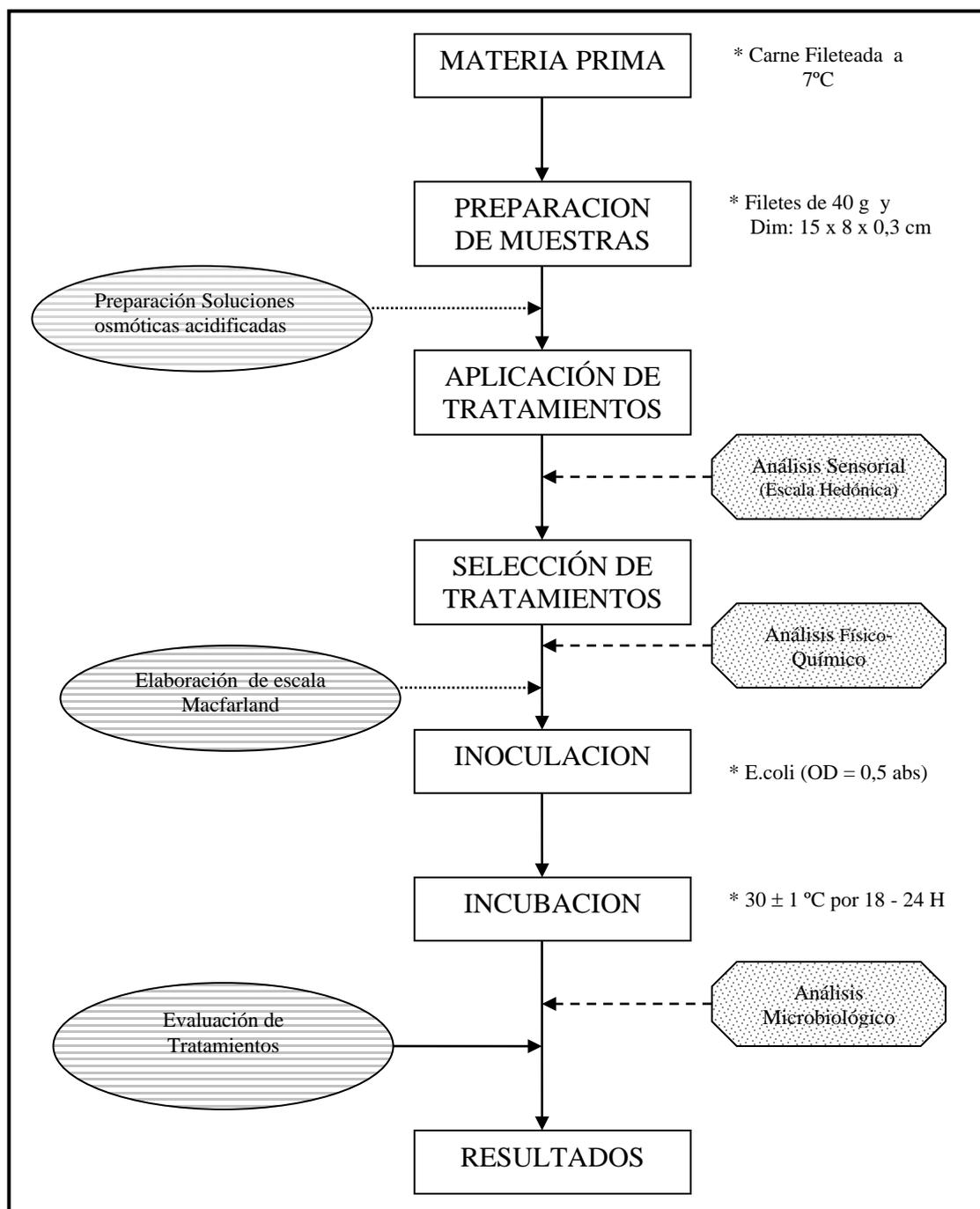


Fig. 3.3 Esquema de los pasos seguidos en el diseño del experimento

FUENTE: Elaborado por Grace Vásquez V.

3.3 Efecto de la reducción de actividad de agua.

Como se observa en la tabla 14, una reducción substancial de la actividad de agua de 0,99 a 0,93 tuvo un efecto marcado en el decrecimiento de la *Escherichia coli* inoculada. Por ejemplo, se observa una reducción en la carga microbiana de tres ciclos log, después de 2 horas de incubación de la muestra con tratamiento. Por el contrario, en los filetes de res sin tratamiento los recuentos al cabo de 2 horas resultaron muy numerosos para contar (MNC).

TABLA 14

Efecto de Actividad de Agua en el Crecimiento de *E. coli* a Temperatura de 30 ± 2 °C.

TRATAMIENTOS	Aw	<i>E. coli</i> ^a ufc/gr.	<i>E. coli</i> ^b ufc/gr.	<i>E. coli</i> ^c ufc/gr.
Materia prima	0.99	7×10^1	MNC	MNC
4000 ^d	0.92	1.06×10^8	23×10^5	92×10^5

a = recuento en t=0 horas;

b = recuento en t=2 horas;

c = recuento en t=4 horas;

d = tratamiento con solución osmótica 40% sin acidificar.

FUENTE: Elaborado por Grace Vásquez V.

Lo anteriormente descrito se debió a que a valores de actividad de agua inferiores a 0.95, la velocidad de crecimiento y la masa celular final disminuye y la fase de latencia aumenta. Esto se debe al efecto

que proporciona el cloruro de sodio no sólo en la reducción de la actividad de agua en el alimento, sino también al encogimiento que produce en el volumen celular del *E. coli*, debido a la pérdida de agua a nivel citoplasmático (1, 6, 8, 21).

Al cabo de cuatro horas de incubación se realizó un nuevo recuento y se observó un leve incremento del mismo. Sin embargo, este valor se mantuvo dentro del ciclo logarítmico obtenido en el recuento anterior. Este ligero repunte tiene su explicación a través de los mecanismos homeostáticos; mediante los cuales, los microorganismos sobrevivientes tratan de sobreponerse al medio inhóspito, acumulando suficientes *solutos compatibles* a nivel citoplasmático (mecanismo de osmoregulación). Por medio de este mecanismo, el *Escherichia coli* contrarrestó el gradiente de concentración entre el medio interno y el externo de la membrana celular; logrando un efecto protector en la actividad enzimática del mismo (5, 7, 26).

Subsiguientemente, el continuo mantenimiento de los gradientes de concentración de soluto a través de la membrana celular terminan provocando reacciones de stress, que disminuyen la tasa de crecimiento microbiano y prolongan la fase lag. De esta forma, es

como, la tecnología de obstáculos (barreras) logra retardar el deterioro de los alimentos. Además, este efecto puede incrementarse aplicando otras barreras.

Bajo las condiciones anteriormente descritas, las bacterias Gram-negativas inicialmente causantes de alteración en la carne fresca, así como, la mayoría de las bacterias patógenas productoras de enfermedades alimentarias (*Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Salmonella* spp., *Vibrio parahemolyticus*, *E.coli*) se inhiben (4, 14, 25, 27).

Consecuentemente, las bacterias Gram-positivas (*Lactobacillaceae*, *Bacillaceae* y *Micrococaceae*) podrían constituirse en la nueva flora microbiana de importancia en el deterioro del alimento, lo cual podría resultar irrelevante si el interés inicial del tratamiento radica en la reducción de la carga microbiana. En definitiva, este efecto puede mermarse si se aplica un buen sistema de calidad e higiene durante la explotación, procesamiento y comercialización de la carne de res.

3.4 Efecto de la reducción de pH y adición de ácidos orgánicos.

Los ácidos orgánicos empleados fueron incorporados en la carne a través de la solución osmótica; y su efecto inhibitorio se valoró por la concentración de ácido no disociado presente, el cual a su vez

dependió del pH. Esta fracción de ácido no disociado es 60 a 100 veces más inhibitor que el ácido disociado; su eficacia en la reducción del pH y su aporte de ácidos no disociados en los tratamientos se puede observar en la tabla 15.

TABLA 15

Parámetros físico-químicos evaluados en la carne de res, luego de la acidificación.

Tratamientos	pH	% Acidez	Proporción de ácido no disociado	% de ácido no disociado
40C02	5.18	0.17	0.0034	0.0006
40C2	4.75	0.40	0.050	0.020
40L05	5.21	0.38	0.049	0.019
40L1	4.89	0.68	0.097	0.066
40AC2	5.70	0.21	0.14	0.003
40AC4	5.49	0.48	0.203	0.097

40C02 = Ac. Cítrico 0.2%; 40C2 = Ac. Cítrico 2%; 40L05 = Ac. Láctico 0.5%;
40L1 = Ac. Láctico 1%; 40AC2 = Ac. Acético 2%; 40AC4 = Ac. Acético 4%

FUENTE: Elaborado por Grace Vásquez V.

Durante los ensayos, se observó que tanto el ácido cítrico al 2% (p/v) como el ácido láctico al 1% (v/v) tuvieron un efecto desagradable (decoloración) en la apariencia de la carne cruda, luego de 4 horas de exposición al ambiente. Este cambio

desfavorable en la apariencia de la carne cruda se debió a una desnaturalización proteica, producto de un descenso en el pH por debajo del punto isoeléctrico de la proteína cárnica, como se explicó anteriormente. Contrariamente, la adición de ácido cítrico al 0.2% (p/v) y ácido láctico 0,5% (v/v) no tuvieron efecto en la apariencia del producto; por ello, estos fueron considerados en las experimentaciones con *Escherichia coli* (Apéndice M).

En la tabla 16 se puede observar, que las muestras tratadas con ácido cítrico al 0,2 % y acético al 4%, los recuentos de *E. Coli* se mantuvieron en descenso, luego de cuatro horas. Esto indicaría que el microorganismo realmente no pudo sobreponerse al medio inhóspito, debido a que el porcentaje de ácido no disociado en la carne fue mayor al mínimo requerido para la inhibición de este tipo de microorganismo. Lo que no ocurrió en el ácido acético al 2%, donde la concentración de ácido no disociado fue menor a la mínima inhibitoria (6, 12, 23).

En el caso específico del ácido láctico 0,5 %, a pesar de que la concentración de ácido no disociado fue mayor al mínimo inhibitorio, su débil efecto se debió a su interacción con el cloruro de sodio, lo que se explicará más adelante.

Es conocido que la mayor parte de los microorganismos, a excepción de los ácido-sensibles, pueden desarrollarse en un amplio intervalo de pH. Cabría pensar, que el *E. coli* dispone de mecanismos eficaces para estabilizar su pH interno. Por lo tanto, el efecto inhibitorio observado posiblemente este dado por la fracción no disociada de los ácidos.

TABLA 16

Efecto de la concentración de ácido no disociado en la inhibición del Escherichia coli a 30± 2°C.

Ensayos	% de ácido no disociado	% ácido no disociado mínimo inhibitorio	E. coli ^a ufc/gr.	E. coli ^b ufc/gr.	E. coli ^c ufc/gr.
Blanco ^d	0	0	1.06 x 10 ⁸	23 x 10 ⁵	92 x 10 ⁵
40C02	0.0006	0.0005	1.06 x 10 ⁸	94 x 10 ⁵	43 x 10 ⁵
40L05	0.019	0.01	1.06 x 10 ⁸	20 x 10 ⁵	59 x 10 ⁵
40AC2	0.003	0.05	1.06 x 10 ⁸	38 x 10 ⁵	57 x 10 ⁵
40AC4	0.097	0.05	1.06 x 10 ⁸	31 x 10 ⁵	26 x 10 ⁵

a = recuento en t=0 horas;

b = recuento en t=2 horas;

c = recuento en t=4 horas;

d = tratamiento con solución osmótica sin acidificación.

FUENTE: Elaborado por Grace Vásquez V.

3.5 Efecto Sinérgico de las Barreras Seleccionadas

En la tabla 17 se puede observar que la concentración de cloruro de sodio disminuyó al adicionar un ácido cualquiera, esto influyó directamente en los valores de actividad de agua. Este fenómeno puede deberse a un cambio en las difusividades de los componentes de la solución osmótica, los cuales compiten entre sí para ingresar en la carne (19). Consecuentemente, al adicionar el ácido en la solución osmótica la difusividad del cloruro de sodio a través del alimento disminuyó, este efecto es mayor si adicionalmente incrementamos la concentración del ácido.

Con respecto al crecimiento de *Escherichia coli*, se pudo observar que todos los tratamientos aplicados redujeron los recuentos en tres ciclos log. Si comparamos el tratamiento 4000, en el cual sólo se aplicó una reducción de la actividad de agua, con los demás tratamientos en los que la acidificación constituyó una barrera más, se puede observar que en el primero el crecimiento de *E. coli* fue mayor. Demostrando así, que la combinación de barreras produce una mejor inhibición microbiana y como consecuencia una mayor estabilidad del alimento (1).

TABLA 17

Efecto sinérgico de los tratamientos aplicados en la inhibición del *Escherichia coli* a 30 ± 2 °C.

TRATAMIENTOS	Aw	pH	% de ácido no disociado	<i>E. coli</i> ufc/gr. ^a	<i>E. coli</i> ufc/gr. ^b
Materia prima	0.99	5.30	0	7×10^1	MNC
4000 ^c	0.92	5.23	0	1.06×10^8	92×10^5
40C02	0.93	5.18	0.0006	1.06×10^8	43×10^5
40L05	0.92	5.21	0.019	1.06×10^8	59×10^5
40AC2	0.94	5.70	0.067	1.06×10^8	57×10^5
40AC4	0.95	5.49	0.043	1.06×10^8	26×10^5

a = recuento en t=0 horas;

b = recuento en t=4 horas;

c = tratamiento con solución osmótica sin acidificación.

FUENTE: Elaborado por Grace Vásquez V

En el caso particular del ácido láctico al 0,5 % (v/v), su débil efecto en la inhibición microbiana se debió a su combinación con el cloruro de sodio. Según estudios realizados (6, 12, 23), se ha podido establecer que la combinación simultánea de cloruro de sodio y ácido láctico incrementan la tasa de supervivencia del *E. coli*. Este efecto protector es debido principalmente a un incremento del pH citoplasmático de la célula bacteriana. De tal manera, que lo observado en los experimentos con ácido láctico comprobaría los

estudio in Vitro realizado por Casey and Condon (2002). Por otro lado, contradice el criterio generalizado de otros autores de que mezclas de cloruro de sodio con ácidos orgánicos tienen muy poco efecto en la inhibición del E.coli.

En definitiva, se obtuvieron mejores efectos inhibitorios sobre el E. coli con los tratamientos 40AC4 y 40C02. Si analizamos el hecho que el tratamiento 40AC4 produjo una ligera decoloración en la carne, podríamos sugerir como el mejor tratamiento 40C02.

CAPITULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

1. En este estudio se comprobó que la combinación de mínimos procesos de preservación como la reducción de la actividad de agua y la acidificación con ácidos orgánicos débiles, produjeron un efecto inhibitorio en el crecimiento del *Escherichia coli*. Cabe recalcar, que es preciso tener un conocimiento del mecanismo de acción de cada barrera respecto a una determinada cepa, sustrato y medio. De tal manera, que puedan ser combinadas adecuadamente a fin de obtener un alimento con una mayor estabilidad e inocuidad. También, es importante estudiar la

interacción de las barreras ya que pueden producir un efecto contrario al deseado.

2. A pesar de que la *Escherichia coli* puede desarrollarse a pHs entre 4,4 y 9. Se demostró que su tolerancia dependió mucho del tipo de ácido empleado en la acidificación. Es así que, a valores de pH de $5,3 \pm 0,2$ el ácido acético resulto ser más inhibitor que los ácidos cítrico y láctico.
3. Al analizar la relación sinérgica entre las barreras se comprobó que la interacción cloruro de sodio y ácido láctico tuvieron un efecto protector que favoreció la supervivencia del E. coli. Este efecto es de gran interés en el área de seguridad alimentaria, ya que explicaría el mecanismo por el cual este microorganismo puede causar enfermedades.



IB - ESPOL

Recomendaciones

1. La microbiología de este tipo de producto es compleja ya que la estabilidad depende de numerosos factores y de la relación sinérgica entre ellos. Por ello, es esencial que las barreras sean debidamente formuladas y aplicadas de forma homogénea para

evitar áreas localizadas donde se pueda producir crecimiento de microorganismos.

2. Cabe recalcar que la aplicación de tecnología de obstáculos (barreras) debe realizarse únicamente en alimentos microbiológicamente seguros. Comprobándose, ser un tratamiento eficiente en la reducción de carga microbiana proporcionándole mayor estabilidad al alimento.

BIBLIOGRAFÍA

1. ALBRIGHTA, S.; KENDALLA, P.; AVENSA, J.; SOFOSB, J., Pretreatment effect on inactivation of Escherichia coli O157:H7 inoculated beef jerky, Iwt, Volumen 36, págs. 381-389, 2003.
2. ANZALDÚA-MORALES A., La Evaluación Sensorial de los Alimentos en la Teoría y la Práctica, Editorial Acribia, Zaragoza-España, 1994.
3. ARCOS, M.L.; OSSA, F.; DÍAZ, T., Criopreservación de aislados nativos de bacterias. Artículo Científico. Revista Corpoica, Volumen 5 N°1, págs. 60-63, 2004.
4. BORCH, E., KANT-MUERMANS, M. L.; AND BLIXT, Y., Bacterial spoilage of Meat and Cured Meat Products. In Swedish Meat Research Institute. J Food Microbiology, Volumen 33, págs.103 -120, 1996.

5. CARNEYA, E.; O'BRIENA, S.B.; SHERIDANA, J.J.; MCDOWELLB, D.A.; BLAIRB, I.; DUFFYA, G., Prevalence and level of *Escherichia coli* O157 on beef trimmings, carcasses and boned head meat at a beef slaughter plant, *Food Microbiology*, Volumen 23, págs. 52-59, 2006.
6. CASEY, PAT; SÉAMUS CONDON, Sodium Chloride decreases the bacteriocidal effect of acid pH on *Escherichia coli* O157:H45. *International Journal of Food Microbiology*, Volumen 76, págs. 199-206, 2002.
7. COIA, J.; JOHNSTON, Y.; STEERS, N.; HANSON, M., A survey of the prevalence of *Escherichia coli* O157 in raw meats, raw cow's milk and raw-milk cheeses in south-east Scotland, *International Journal of Food Microbiology*, Volumen 66, págs. 63-69, 2001.
8. COMAPOSADA, J.; GOU, P.; ARNAU, J., The effect of Sodium Chloride content and temperature on pork meat isotherms. *Meat Science*, Volumen 55, págs. 291-295, 2000.

9. CHAPMAN, P.A.; ASHTON, R., An evaluation of rapid methods for detecting *Escherichia coli* O157 on beef carcasses, *International Journal of Food Microbiology*, Volumen 87, págs. 279-285, 2003.
10. GIRARD, J., *Tecnología de la Carne y de los Productos Cárnicos*, Editorial Acribia Zaragoza - España, 1991.
11. GONZALEZ, L.D.; TAMAGNINI, L.; OLMOS, P., Evaluation of a Chromogenic medium for total Coliforms and *Escherichia coli* determination in ready – to – eat food. *Food Microbiology*, Volumen 20, págs. 601-604, 2003.
12. HAJMEER, M.N.; MARSDEN, J.L.; FUNG, D.Y.C.; KEMP, G.K., Water, Sodium chloride and acidified sodium chlorite effects on *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* on beef briskets. *Meat Science*, Volumen 68, págs. 277 – 283, 2004.
13. HAYES, P. R., *Microbiología E Higiene De Los Alimentos*, Acribia, Zaragoza, 1993.
14. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS (ICMSF), *Ecología Microbiana de los*

Alimentos: Factores que Afectan a la Supervivencia de los Microorganismos en los Alimentos, Volumen I, Editorial Acribia, Zaragoza – España, 1980.

15. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS, ICMSF, Microorganismos De Los Alimentos: Características De Los Patógenos Microbianos, Acribia, Zaragoza- España, 1996.

16. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS, ICMSF, Microorganismos De Los Alimentos: Métodos De Muestreo Para Análisis, Acribia, Zaragoza- España, 1981.

17. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS, ICMSF, Microorganismos De Los Alimentos: Su Significado y Métodos de Enumeración, Acribia, Zaragoza- España, 2000.

18. KARTHIKEYAN, J; KUMAR SUSHIL, ANJANEYULU, A.S.R; RAO, K..H, Application of Hurdle Technology for the development of Caprine

Keema and its stability at ambient temperature. Meat Science, Volumen 54, págs. 9 -15, 2000..

19.LABUZA T. Moisture Sorption: Practical Aspects of Isotherm Measurement and Use, American Association of cereal Chemists, St. Paul-Minnesota – EEUU, 1984.

20.LEBERT, I.; BEGOT, C.; LEBERT, A., Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* in a meat medium as affected by pH (5.8–7.0), water activity (0.97– 1.00) and temperature (7–25°C), International Journal of Food Microbiology, Volumen 39, págs. 53-60, 1998.

21.LEISTNER L., GRAHAME W. GOULD, Hurdle Technologies: Combination Treatments for Food Stability Safety and Quality, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York- EEUU, 2002.

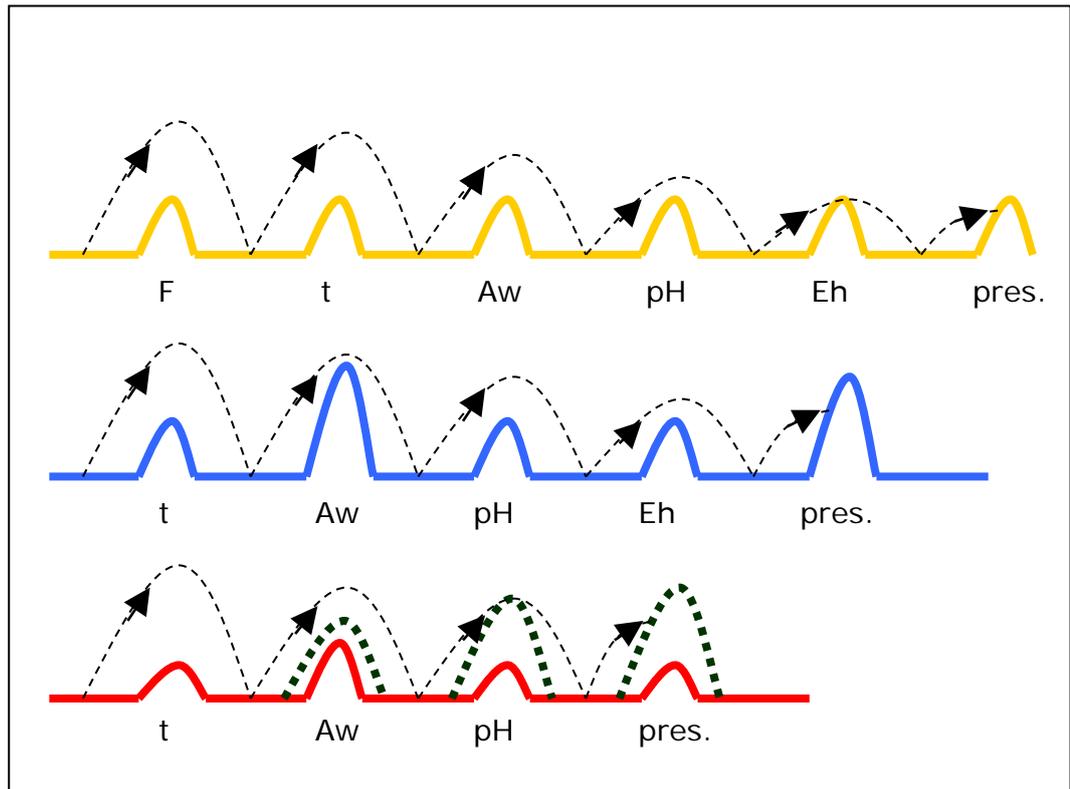
22.LÓPEZ DE LA TORRE G., CARBALLO B., MADRID A., Tecnología de las Carnes y de los Productos Cánicos, 1º Edición, Editorial Mundi Prensa y AMV, Madrid –España, 2001.

23. MELLEFONT, L.A.; MCMEEKIN, T.T.; ROSS, T., Performance evaluation of a model describing the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth of *Escherichia coli*, *International Journal of Food Microbiology*, Volumen 82, págs. 45-58, 2003.
24. MOUNTNEY, G., *Practical Food Microbiology and Technology*, Avi, New York., 1998.
25. MOSSEL, D., 1985, *Microbiología de los Alimentos: Fundamentos Ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos*, Acribia, Zaragoza-España, 1985.
26. QIONGZHEN Li; SHERWOOD, J.; LOGUE, C., The prevalence of *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli* and *Escherichia coli* O157:H7 on bison carcasses during processing. *Food Microbiology*, Volumen 21, págs. 791-799, 2004.
27. SALGUERO, F.; GOMEZ, R.; CARMONA, M., , Water Activity in Selected High-Moisture Foods, *Journal of Food Composition and Analysis*, Volumen 6, págs. 364-369, 1993.

28. WPA, Manual Cell Density CO8000, Biochrom Ltda. 22, Cambridge Science Park, Inglaterra-Reino Unido, 2006.

APÉNDICE A

ILUSTRACIÓN DEL EFECTO BARRERA



Simbología: F, calentamiento; t, enfriamiento; Aw, actividad de agua; pH, acidificación; Eh, potencial redox; pres., preservantes.

FUENTE: Hurdle Technologies: Combination Treatments for Food Stability Safety and Quality, 2002.

APÉNDICE B

PROPIEDADES DE ALGUNOS ÁCIDOS ORGÁNICOS UTILIZADOS EN ALIMENTOS

Acido Orgánico	Formula Química	pKa	Solubilidad (g /100 g.)	ADI ^a (mg / Kg de peso corporal)
Ac. Acético	CH ₃ COOH	4,75	Muy soluble	Ilimitada
Ac. Cítrico	(COOH)CH ₂ C-(OH)(COOH) - CH ₂ COOH	3,1	Muy soluble	Ilimitada
Ac. Láctico	CH ₃ CHOHCOOH	3,1	Muy soluble	Ilimitada

a Ingestión diaria aceptable

FUENTE: FAO/WHO, 1973

PROPORCIÓN DE ÁCIDO NO DISOCIADO A DIFERENTES VALORES DE pH ^a.

ACIDO	VALORES DE pH				
	3	4	5	6	7
ACETICO	98.5	84.5	34.9	5.1	0.54
BENZOICO	93.5	59.3	12.8	1.44	0.144
CITRICO	53.0	18.9	0.41	0.006	< 0.001
LACTICO	86.6	39.2	6.05	0.64	0.064
PROPIONICO	98.5	87.6	41.7	6.67	0.71
SORBICO	97.4	82.0	30.0	4.1	0.48

a Valores expresados en porcentaje (%).

FUENTE: Ecología Microbiana de los Alimentos, 1980

APÉNDICE C

ESPECTRO ANTIMICROBIANO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS, UTILIZADOS EN ALIMENTOS, EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO (DE CHICHESTER Y TANNER, 1972)^A.

	Concentraciones de ácido no disociado precisas para la inhibición del crecimiento de la mayor parte de cepas.				
ACIDO	LEVADURAS	MOHOS	ENTEROBACTERIACEAS	MICROCOCACEAE	BACILLACEAE
Acético	0.5	0.1	0.05	0.05	0.1
Benzoico	0.05	0.1	0.01	0.01	0.02
Cítrico	>0.005 ^b	>0.005	>0.005	0.001 ^c	>0.005
Láctico	>0.01	>0.02	>0.01	>0.01	>0.03
Propiónico	0.2	0.05	0.05	0.1	0.1
Sórbico	0.02	0.04	0.01	0.02	0.02 ^d

^a Valores expresados como porcentaje en la solución.

^b Las concentraciones inhibitorias son muy superiores que este valor.

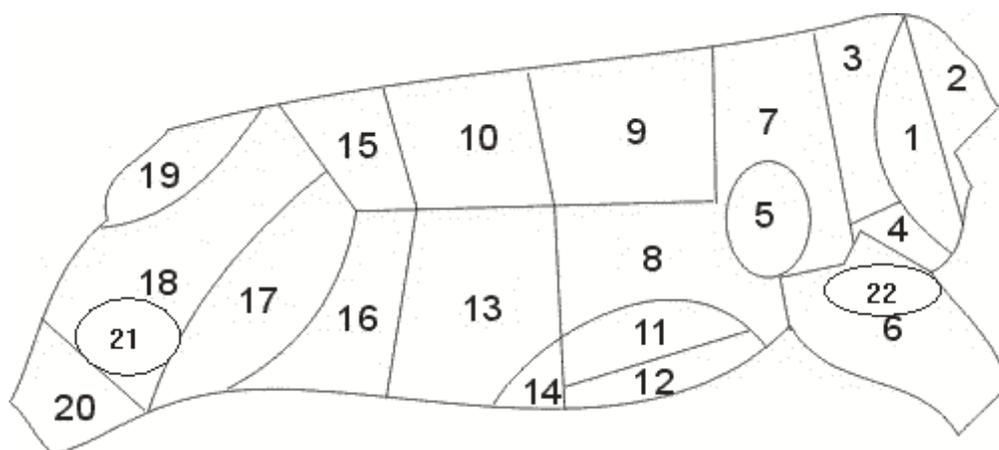
^c Valores referidos a *St. aureus*

^d Los clostridios son generalmente mas resistentes.

FUENTE: Ecología Microbiana de los Alimentos, 1980

APÉNDICE D

CORTES DE CARNE DE RES



1	Azotillo	12	Falda
2	Primo	13	Vacío
3	Paleta chata	14	Matambre
4	Jamón de paleta	15	Verija
5	Paleta	16	Colita de cuadril
6	Puchero especial	17	Choquizuela
7	Tira de lomo	18	Trasjamón
8	Costilla	19	Peceto-Jamón
9	Costeleta rolliza	20	Puchero especial
10	Costeleta lisa	21	Picana
11	Asado	22	Duro

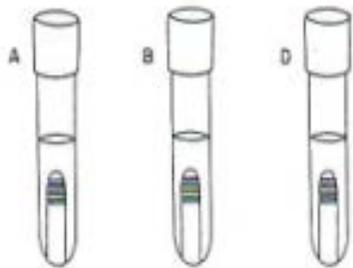
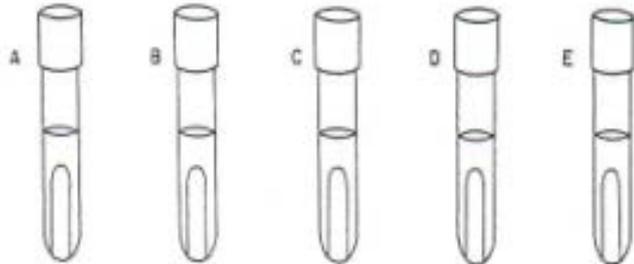
FUENTE: Los datos aquí consignados se tomaron del calendario 2006 del Instituto de Promoción de la Carne Vacuna Argentina (www.ipcva.com.ar).

APÉNDICE E

DIAGRAMA DEL MÉTODO DEL NÚMERO MÁS PROBABLE PARA EL AISLAMIENTO DE ESCHERICHIA COLI

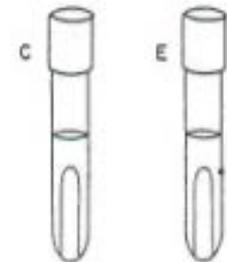
A. PRUEBA PRESUNTIVA

SE INOCULAN 10 ml DE LA MUESTRA DE AGUA A CADA UNO DE LOS 5 TUBOS DEL CALDO DE LAURIL TRIPTOSA, Y SE INCUBAN POR 24 ± 2 Hs a $35^{\circ} \pm 0.5$ °C



EXISTE PRODUCCION DE GAS
PRUEBA PRESUNTIVA POSITIVA

SIN GAS O CON PRODUCCION DUDOSA
DE GAS SE INCUBA POR 25 Hs MAS
(INCUBACION TOTAL 48 ± 2 Hs)



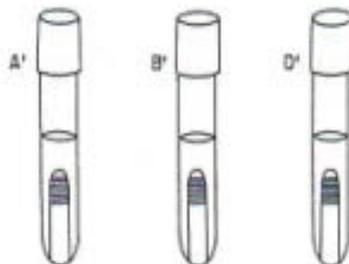
B. PRUEBA CONFIRMATIVA SE TRANSFIERE CON EL ASA UN INOCULO A1

CALDO LACTOSADO BILIS VERDE BRILLANTE. SE INCUBA POR 48 ± 2 Hs a $35^{\circ} \pm 0.5$ °C



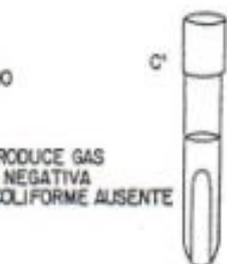
EXISTE PRODUCCION DE GAS
PRUEBA POSITIVA

NO SE PRODUCE GAS
PRUEBA NEGATIVA
GRUPO COLIFORME AUSENTE



SE PRODUCE GAS
GRUPO COLIFORME CONFIRMADO

NO SE PRODUCE GAS
PRUEBA NEGATIVA
GRUPO COLIFORME AUSENTE

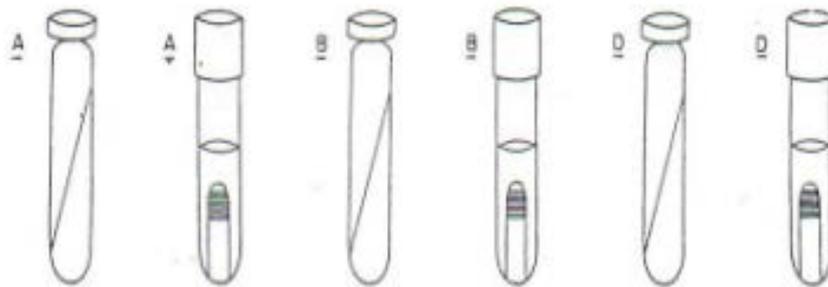


FUENTE: ICMSF, 1980.

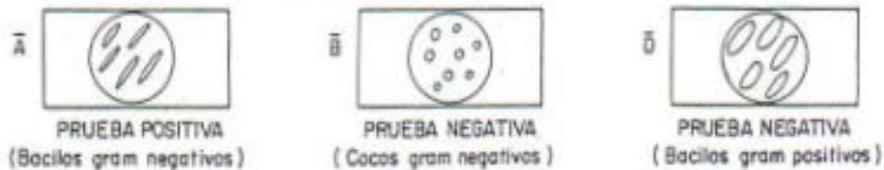
C. PRUEBA COMPLEMENTARIA. LOS INOCULOS DE LOS TUBOS A', B' y D' SE APLICAN EN ESTRIAS SOBRE LAS PLACAS DE AGAR EOSINÁ AZUL DE METILENO. (EMB) SE INCUBAN POR 24 ± 2 Hs, a $35^\circ \pm 0.5^\circ \text{C}$



SE TRANSFIERE UNA PEQUEÑA PORCIÓN DEL DESARROLLO DE UNA PLACA DE EMB ó AGAR NUTRIENTE ADOPTANDO UN PLANO INCLINADO DENTRO DEL TUBO DE ENSAYO Y AL CALDO DE LAURIL TRIPTOSA. SE INCUBAN LOS TUBOS DE CALDO DE LAURIL TRIPTOSA POR 24 ó 48 ± 2 Hs, a $35^\circ \pm 0.5^\circ \text{C}$



SE PREPARA UNA TINCION DE GRAM CON UNA PEQUEÑA PORCIÓN DEL DESARROLLO BACTERIANO DE CADA TUBO DE AGAR NUTRIENTE INCLINADO



PRUEBA COMPLETA POSITIVA: SE DEMUESTRA LA PRODUCCION DE GAS, BACILOS ESPOROGENOS TINCION GRAM NEGATIVA (roja) IDENTIFICADOS

PRUEBA COMPLETA NEGATIVA: NO SE CUMPLE CON ALGUNO O CON TODOS LOS REQUISITOS ANTERIORES DE LA PRUEBA COMPLETA POSITIVA

FUENTE: ICMSF, 1980.

APÉNDICE F

VALORES DE E_i PARA LA ECUACIÓN DE GROVER

INGREDIENTE	E_i
Sucrosa	1.0
Lactosa	1.0
Azúcar invertida	1.3
42 DE	0.8
Proteínas	1.3
Almidón	0.8
Gomas	0.8
Ácidos	2.5
Glicol	4.0
Sal	9.0
Grasa	0

FUENTE: Moisture Sorption: Practical Aspects of Isotherm Measurement and Use Moisture Sorption, LABUZA T. 1984

APÉNDICE G

CÁLCULO DEL VALOR DE ACTIVIDAD DE AGUA DE LA CARNE DE RES (Ecuación de Grover).

BALANCE DE COMPONENTES

TRATAMIENTO AC. CITRICO 0,2%

Pi	39,96
Hi	74,70
Pf	37,57
% Aci	0,00
%Hf	68,22
%Pi	24,00
%Gi	1,30
%CIna	5,80
%Acf	0,17

GRAMOS %

Humedad	25,63	66,86
Proteína	9,59	25,02
Grasa	0,52	1,36
CINA	2,18	5,68
CHO	0,35	0,91
ACIDO	0,06	0,17
	38,34	100,00

TRATAMIENTO AC. ACETICO 2%

Pi	42,05
Hi	74,70
Pf	39,67
% Aci	0,00
%Hf	67,54
%Pi	24,00
%Gi	1,30
%CIna	5,22
%Acf	0,48

GRAMOS %

Humedad	26,79	67,22
Proteína	10,09	25,31
Grasa	0,55	1,37
CINA	2,07	5,20
CHO	0,17	0,42
ACIDO	0,19	0,48
	39,86	100,00

TRATAMIENTO AC. LACTICO 0,5%

Pi	41,84
Hi	74,70
Pf	38,61
%Aci	0,00
%Hf	68,33
%Pi	24,00
%Gi	1,30
%CIna	6,13
%Acf	0,38

GRAMOS %

Humedad	26,38	65,62
Proteína	10,04	24,97
Grasa	0,54	1,35
CINA	2,37	5,89
CHO	0,72	1,80
ACIDO	0,15	0,36
	40,21	100,00

TRATAMIENTO SOL. 40 °BRIX

Pi	39,13
Hi	74,70
Pf	34,90
%Aci	0,00
%Hf	68,28
%Pi	24,00
%Gi	1,30
%CIna	7,42
%Acf	

GRAMOS %

Humedad	23,83	63,15
Proteína	9,39	24,88
Grasa	0,51	1,35
CINA	2,59	6,86
CHO	1,42	3,76
ACIDO	0,00	0,00
	37,74	100,00

CARNE SIN TRATAMIENTO

	<u>%</u>	<u>mi</u>	<u>Ei</u>	<u>Ei/mi</u>
AGUA	74,7	X	X	X
PROTEINA	24	3,1125	1,3	0,4176707
GRASA	1,3	57,461538	0	0
SAL			9	
AZUCAR			1	
ACIDOS			2,5	
	100			0,4176707

aw = 0,999

ACIDO CITRICO 0.2%

	<u>%</u>	<u>mi</u>	<u>Ei</u>	<u>Ei/mi</u>
AGUA	66,86	X	X	X
PROTEINA	25,02	2,99	1,30	0,44
GRASA	1,36	55,12	0,00	0,00
SAL	5,68	13,14	9,00	0,68
AZUCAR	0,91	81,97	1,00	0,01
ACIDOS	0,17	439,41	2,50	0,01
	100,00			1,14

Aw = 0,932

ACIDO LACTICO 0,5%

	<u>%</u>	<u>mi</u>	<u>Ei</u>	<u>Ei/mi</u>
AGUA	65,62	X	X	X
PROTEINA	24,97	2,99	1,30	0,43
GRASA	1,35	55,22	0,00	0,00
SAL	5,89	12,69	9,00	0,71
AZUCAR	1,80	41,51	1,00	0,02
ACIDOS	0,36	204,69	2,50	0,01
	100,00			1,18

Aw = 0,928

ACIDO ACETICO 2%

	<u>%</u>	<u>mi</u>	<u>Ei</u>	<u>Ei/mi</u>
AGUA	67,22	X	X	X
PROTEINA	25,31	2,95	1,30	0,44
GRASA	1,37	54,48	0,00	0,00
SAL	5,20	14,38	9,00	0,63
AZUCAR	0,42	176,17	1,00	0,01
ACIDOS	0,48	156,37	2,50	0,02
	100,00			1,09

Aw =	0,937
-------------	--------------

SOL. 40 °BRIX

	<u>%</u>	<u>mi</u>	<u>Ei</u>	<u>Ei/mi</u>
AGUA	63,15	X	X	X
PROTEINA	24,88	3,0018489	1,3	0,4330664
GRASA	1,35	55,418748	0	0
SAL	6,86	10,885988	9	0,8267509
AZUCAR	3,76	19,867606	1	0,0503332
ACIDOS				
	100,00			1,3101505

Aw =	0,917
-------------	--------------

FUENTE: Elaborado por Grace Vásquez V.

APÉNDICE H

CÁLCULO DEL VALOR DE ACTIVIDAD DE AGUA DE LAS SOLUCIONES OSMÓTICAS

INGREDIENTES	40 ° Brix (1:1) GRAMOS	50 °Brix (1:1) GRAMOS	60 ° Brix (1:1) GRAMOS
AGUA	56	46	36
SUCROSA	22	27	32
SAL	22	27	32

Sol. 40 ° Brix (1:1)

CLNa =	56 g H2O/ 22 g de ClNa = 2,545	254,5 g H2O/100 g de ClNa
Sucrosa =	56 g H2O/ 22 g de ClNa = 2,545	254,5 g H2O/100 g de Sucrosa

Ley de Raoult's

Aw ClNa =	$(254,5 / 18) / ((254,5/18) + (100/58,5) * 2) =$	0,805
Aw Sucrosa =	$(254,5 / 18) / ((254,5/18) + (100/342,3)) =$	0,98

Ecuación de Roos

Aw Solución = $0,805 * 0,98 =$ **0,788**

Sol. 50 ° Brix (1:1)

CLNa =	46 g H2O/ 27 g de ClNa = 1,70	70,37g H2O/100 g de ClNa
Sucrosa =	46 g H2O/ 27 g de ClNa = 1,70	170,37g H2O/100 g de Sucrosa

Ley de Raoult's

Aw ClNa =	$(170,37/ 18) / ((170,37/18) + (100/58,5) * 2) =$	0,735
Aw Sucrosa =	$(170,37/ 18) / ((170,37/18) + (100/342,3)) =$	0,97

Ecuación de
Roos

$$Aw \text{ Solución} = 0,735 * 0,97 = \boxed{0,713}$$

**Sol. 60 ° Brix
(1:1)**

$$CLNa = 36 \text{ g H}_2\text{O} / 32 \text{ g de ClNa} = 1,125 \qquad 112,5 \text{ g H}_2\text{O} / 100 \text{ g de ClNa}$$

$$Sucrosa = 36 \text{ g H}_2\text{O} / 32 \text{ g de ClNa} = 1,125 \qquad 112,5 \text{ g H}_2\text{O} / 100 \text{ g de ClNa}$$

Ley de Raoult's

$$Aw \text{ ClNa} = (112,5/18) / ((112,5/18) + (100/58,5) * 2) = 0,646$$

$$Aw \text{ Sucrosa} = (112,5/18) / ((112,5/18) + (100/342,3)) = 0,955$$

Ecuación de
Roos

$$Aw \text{ Solución} = 0,646 * 0,955 = \boxed{0,617}$$

FUENTE: Elaborado por Grace Vásquez V.

APÉNDICE I

CUESTIONARIO PARA LA EVALUACIÓN DEL GRADO DE SATISFACCIÓN DE FILETES DE RES TRATADOS.

Producto: _____ **Fecha:** _____

Usted recibirá un conjunto de cuatro muestras. Pruebe las muestras una por una de izquierda a derecha. No olvide enjuagar su boca con agua luego de cada degustación. Finalmente marque con una X en el lugar que indique su opinión acerca de cada muestra.

ESCALA	368	594	218	702
Me gusta mucho				
Me gusta ligeramente				
Ni me gusta ni me disgusta				
Me disgusta ligeramente				
Me disgusta mucho				

Comentarios:

¡MUCHAS GRACIAS!

FUENTE: Elaborado por Grace Vásquez V.

APÉNDICE K

COMPONENTES Y FUNCIONAMIENTO DEL CELL DENSITY



Teclado	
on/off	Botón de activar / desactivar
R	para ajustar la referencia a 0.000 OD a 600 nm con una referencia
T	to hacer una medición
mem	Botón de Memoria
reset	Pulse dos veces para borrar los valores almacenados
recall / print	Para imprimir los resultados almacenados en la memoria
Presentación visual	Muestra un indicador de número de memoria y un indicador de batería

¿Cómo se realiza una medición?

1. Active el instrumento pulsando el botón ON/OFF.
2. Coloque una muestra de referencia en el compartimiento de cubetas de muestra.
3. Pulse y suelte el botón R (referencia). La presentación visual mostrará 0.00.
4. Retire la muestra de referencia y cámbiela por la solución de muestra en una cubeta o tubo.
5. Pulse y suelte el botón T (prueba). La presentación visual mostrará la OD de la muestra en unidades de absorbancia.

Se pueden comparar muestras múltiples con la misma referencia poniendo diferentes muestras en la cámara de cubetas y haciendo mediciones de cada una. Se recomienda repetir la medición de referencia con la solución referencia cada 10 a 15 minutos para restablecer el instrumento en caso de cualquier variación lenta. Si se tiene duda, repita siempre la medición de referencia.

FUENTE: Manual Cell Density WPA CO 8000, 2006

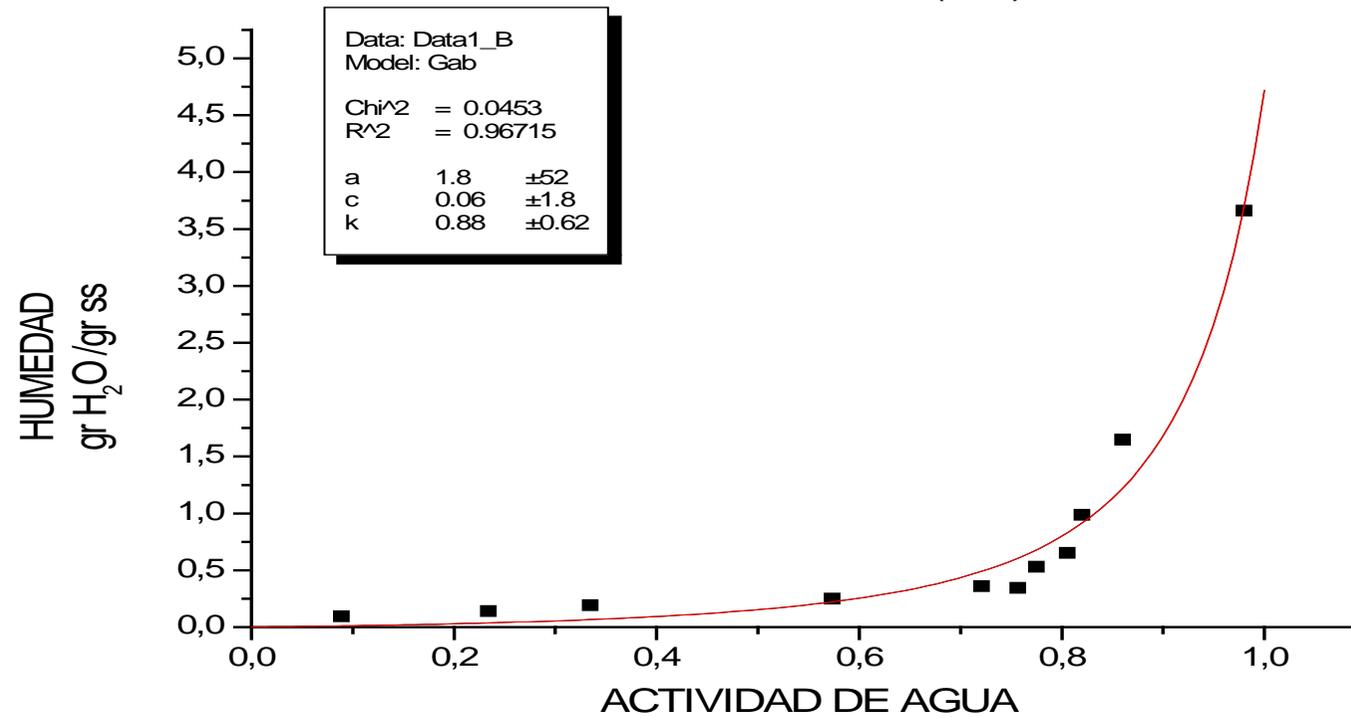
APÉNDICE J

ISOTERMA DE DESORCIÓN DE LA CARNE DE RES FILETEADA (Método Gravimétrico)

REACTIVO	RECIPIENTE	MUESTRA	PERDIDA DE PESO EN GRAMOS				
			1	2	3	4	5
CLORURO DE AMONIO 1	1,4675	1,9758	3,1735	2,7165	2,4445	2,2185	2,116
CLORURO DE AMONIO 2	1,4466	2,1868	3,3003	2,7855	2,4479	2,206	2,144
NITRATO DE MAGNESIO 1	1,4196	2,1853	2,8082	2,061	2,0123	2,0098	2,0032
NITRATO DE MAGNESIO 2	1,4722	2,0997	2,8838	2,0922	2,0624	2,06	2,0593
SULFATO DE POTASIO 1	1,4373	2,3659	3,8285	3,8172	3,7786	3,873	3,8998
SULFATO DE POTASIO 2	1,5033	1,8565	3,3992	3,4063	3,4367	3,3985	3,4827
SULFATO DE AMONIO 1	1,4395	1,8023	2,9128	2,4664	2,1208	2,3646	1,9674
SULFATO DE AMONIO 2	1,4906	2,3972	3,5525	3,0106	2,6196	2,3568	2,2141
CLORURO DE MAGNESIO 1	1,4091	2,4535	2,7674	2,0624	2,0905	2,0555	2,0389
CLORURO DE MAGNESIO 2	1,4663	1,9894	2,4084	1,9837	2,0298	1,9866	1,9775
ACETATO DE POTASIO 1	1,6882	2,6361	2,9052	2,3788	2,362	2,3563	2,3493
ACETATO DE POTASIO 2	1,506	2,3411	2,5392	2,1029	2,0885	2,0872	2,0806
CLORURO DE SODIO 1	1,4838	2,3642	3,3772	2,723	2,2776	2,1732	2,1566
CLORURO DE SODIO 2	1,4285	2,2498	3,2872	2,7043	2,2746	2,1032	2,0588
HIDROXIDO DE SODIO 1	1,4749	2,0802	2,0996	1,9932	1,9851	1,9799	1,9767
HIDROXIDO DE SODIO 2	1,4266	2,4225	2,3248	2,0229	2,0073	2,005	2,0017
CLORURO DE POTASIO 1	1,5391	2,4657	3,7526	3,4648	3,2417	2,9766	2,4811
CLORURO DE POTASIO 2	1,4982	2,2815	3,5616	3,2885	3,0331	2,8247	2,3827
YODURO DE POTASIO 1	1,4632	1,9838	3,0166	2,3833	2,1168	2,0411	2,0266
YODURO DE POTASIO 2	1,4097	2,0235	3,0003	2,4108	2,1426	2,031	2,0169
NITRATO DE SODIO 1	1,4984	2,1691	3,3219	2,8218	2,4479	2,2369	2,1478
NITRATO DE SODIO 2	1,4996	2,2373	3,3424	2,8229	2,4742	2,2432	2,1504

FUENTE: Elaborado por Grace Vásquez V.

ISOTERMA DE DESORCION DE CARNE DE RES (7°C)



FUENTE: Elaborado por Grace Vásquez V.

APÉNDICE L

CARNES DE RES TRATADA CON SOLUCIONES OSMOTICAS Y ACIDOS ORGANISCOS.

Trat. Solución 40 % SS



Trat. Acético 2%



Trat. Cítrico 0.2%



Trat. Láctico 0,5%



CORTE DE RES UTILIZADO



FILETE DE RES

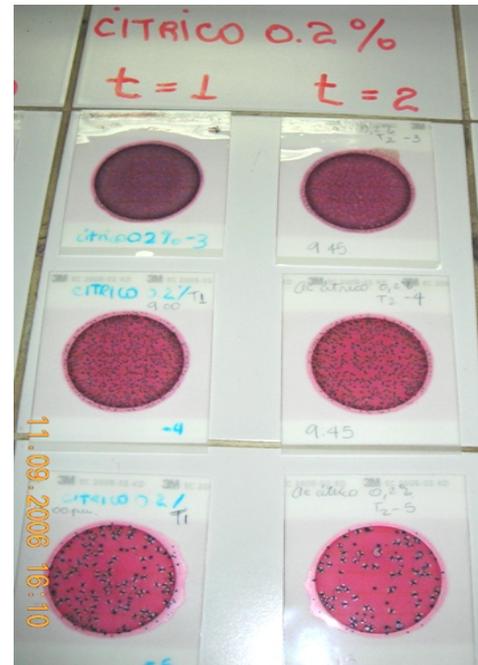
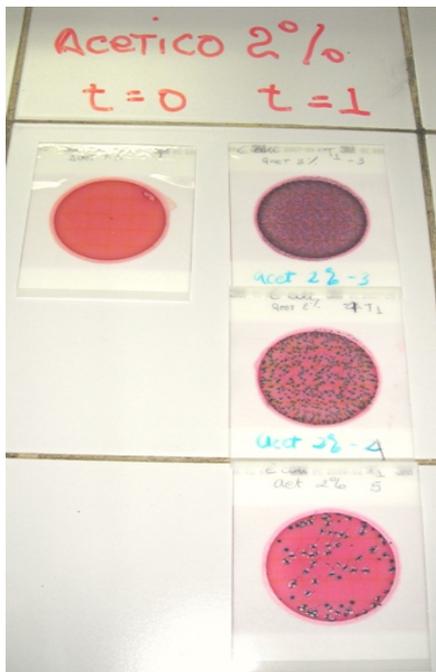
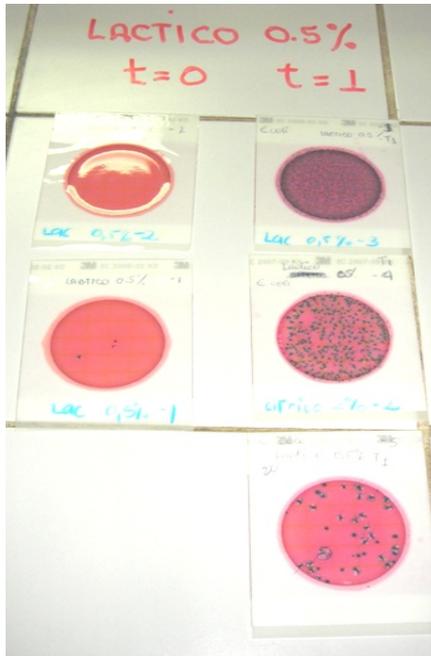


PORCIONES DE 75 g.



APÉNDICE M

TRATAMIENTOS INOCULADOS CON ESCHERICHIA COLI



APÉNDICES