

**EFFECTO DEL SOBRENADANTE DE *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus lactis*  
SOBRE *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus*, COMO MÉTODO DE BIOCONSERVACIÓN DEL LOMO (*Longissimus dorsi*) DE  
CERDO**

**VERÓNICA FERNANDA JARRÍN JARRÍN**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRARIAS  
SAN JUAN DE PASTO**

**2016**

**EFFECTO DEL SOBRENADANTE DE *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus lactis*  
SOBRE *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus*, COMO MÉTODO DE BIOCONSERVACIÓN DEL LOMO (*Longissimus dorsi*) DE  
CERDO**

**VERÓNICA FERNANDA JARRÍN JARRÍN**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al Título de  
Magister en Ciencias Agrarias con Énfasis en Producción Animal**

**Director de trabajo:**

**HENRY JURADO GÁMEZ**

**Zoot. Esp. M.Sc Ph.D**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRARIAS**

**SAN JUAN DE PASTO**

**2016**

### **NOTA DE RESPONSABILIDAD**

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado son responsabilidad exclusiva de los autores”.

Artículo Primero del acuerdo N° 324 de octubre 11 de 1966 emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

**NOTA DE ACEPTACIÓN**

---

---

---

---

---

---

**HÉCTOR FABIO VALENCIA**

**Jurado Delegado**

---

**JAVIER ANDRÉS MARTÍNEZ BENAVIDES**

**Jurado**

---

**CATALINA ESTHER AVENDAÑO**

**Jurado**

---

**HENRY JURADO GÁMEZ**

**Asesor**

**San Juan de Pasto, Marzo de 2016.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi Asesor Doctor Henry Jurado Gámez por su confianza y apoyo en el desarrollo de la presente investigación.

A mis jurados el Doctor Héctor Fabio Valencia, Doctor Javier Andrés Martínez y Doctora Catalina Avendaño por su colaboración y orientación en la conformación del proyecto

A el zootecnista Carlos Bernal por su colaboración incondicional y a todo el personal de laboratorios de la Universidad de Nariño.

A mi familia por su constante apoyo.

Y a todas las personas que de alguna forma hicieron que se haga posible el cumplimiento de este proyecto.

## **DEDICATORIA**

A mi Esposo Thor y a mi hijo Mario Thor por su amor, comprensión y continuo apoyo.

A mi mamá Nelly por su amor y ayuda incondicional.

A Dios por las bendiciones que recibo diariamente.

## RESUMEN

En la primera fase se evaluó el efecto probiótico de las cepas *L. plantarum* y *L. lactis* sobre *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium perfringens*, y *Staphylococcus aureus*; y en la segunda, el efecto bioconservante del sobrenadante de las cepas lácticas sobre lomo (*Longissimus dorsi*) de cerdo. Los análisis se realizaron en el laboratorio de microbiología FISE-PROBIOTEC, Universidad de Nariño. Para la primera fase se determinó: Antibiograma, inhibición *in vitro* de las cepas lácticas sobre las bacterias patógenas, resistencia de las cepas lácticas a 3 pH diferentes (2.5, 4.5 y 7), resistencia de las cepas lácticas a dos temperaturas (38 y 45°C), cinética de fermentación en medio MRS y determinación de péptidos en el sobrenadante mediante HPLC. Para la segunda fase, se evaluaron 8 tratamientos, comprendido por dos factores: ambiente y aditivos de conservación; el primero estuvo compuesto por dos niveles (ambiente: 20°C y refrigeración: 4°C) y el segundo, por cuatro niveles (sin aditivo, aplicación de ácido láctico (500 µl), adición de *L. plantarum* (500 µl) y adición de *L. lactis* (500 µl); a los días 0, 7 y 15 se realizaron mediciones microbiológicas (coliformes totales, coliformes fecales, *Clostridium* sulfito reductor, hongos y levaduras), físico-químicas (pH, acidez y capacidad de retención de agua) y sensoriales (color y olor). Para evaluar los parámetros anteriores se usó un diseño de bloques al azar con arreglo factorial 4X2, usando como bloques los días de evaluación. Sin embargo, para las variables sensoriales, se realizó un análisis de varianza univariado.

*L. plantarum* mostró susceptibilidad a Dicloxacilina, Ciprofloxacina y Penicilina; e inhibió las cepas patógenas, pero su sobrenadante no inhibió a *C. perfringens*; se observó crecimientos de  $1.58 \times 10^{12}$ ,  $2,50 \times 10^{12}$  y  $3,14 \times 10^{12}$  UFC/mL para pH 2, 4.5 y 7 respectivamente, y  $5.2 \times 10^{13}$  y  $3.0 \times 10^{13}$  UFC/mL para 38 y 45°C. *Lactobacillus lactis* presentó resistencia a Dicloxacilina y Cefalotina; e inhibió a *E. coli* y *C. perfringens*, y el sobrenadante incluyó a *S. aureus*; se obtuvo un crecimiento de  $1.1 \times 10^{11}$ ,  $2.1 \times 10^{10}$  y  $1.0 \times 10^{10}$  UFC/ml para

pH 2, 4.5 y 7 respectivamente, y  $1.2 \times 10^{13}$  y  $2.0 \times 10^{13}$  UFC/mL para 45 y 38°C. Se encontró el péptido VAL-TIR-VAL en ambas cepas lácticas mediante HPLC. Para la bioconservación no se encontró interacción entre los factores para ninguna de las variables ( $p>0.05$ ). Los resultados, para coliformes totales en el factor aditivo, no mostraron diferencias estadísticas significativas ( $p>0.05$ ), pero si en el factor temperatura, con un mayor crecimiento en lomos sin refrigerar ( $p<0.05$ ). En coliformes fecales se observó diferencias en ambos factores (aditivo y temperatura) ( $p<0.05$ ). *Clostridium* sulfito reductor mostró ausencia del patógeno. Se observó crecimiento de mohos y levaduras únicamente en el día quince con un rango de 10 a 88 UFC. El pH no mostró diferencias significativas en el factor aditivo ( $p>0,05$ ), pero la temperatura mostró mayor pH para los lomos refrigerados ( $p<0.05$ ). Por otra parte, la acidez indicó diferencias en el factor aditivo ( $p<0.05$ ), con valores más altos para *L. plantarum* (0.097%) en comparación con el ácido láctico (0.088%) y el testigo (0.088%). En la temperatura de conservación, se encontró menores valores en lomo sin refrigerar ( $p<0.05$ ; 0.084%). Los tratamientos tuvieron una mayor influencia sobre el olor, que en el color. Se observó que la adición de ácido láctico afecta estadísticamente el olor desde el primer día (día 0), igual resultado, se observó con *L. lactis* sin refrigeración. Por otra parte, para la variable color, los lomos sin aditivo fueron inaceptables al día 15 y los lomos con *L. plantarum*, al día 7 ( $p< 0.05$ ), ambos expuestos a temperatura ambiente.

Se concluye que *L. lactis* y *L. plantarum* muestran comportamiento bioconservantes en lomo de cerdo; con mayor efectividad de *L. plantarum*.



## ABSTRACT

In the first phase the probiotic effect of the strains *L. plantarum* and *L. Lactis* on *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus* was evaluated; and in the second phase, the effect biopreservative of the raw extract of the lactic bacteria on loin (*Longissimus dorsi*) of pig. The analyses were made in the microbiology laboratory FISE-PROBIOTEC, of Universidad de Nariño. For the first phase it was determined: Antibiogram, inhibition in vitro of the lactic strains on the pathogenic bacterias, resistance of the lactic strains to 3 different pH (2.5, 4.5 and 7), resistance of the lactic strains to two temperatures (38 and 45°C), kinetics of fermentation in MRS cultivation medium and determination of peptides in the raw extract of the lactic bacterias by means of HPLC procedure.

For the second phase, 8 treatments were assessed, comprising two factors: ambient temperature and conservation additives; the first one was compound for two levels (ambient temperature: 20°C and refrigeration: 4°C) and the second, for four levels (without conservation additives, application of lactic acid (500 µl), addition of *L. plantarum* (500 µl) and addition of *L. lactis* (500 µl); on days 0, 7 and 15 were made mensuration microbiological (total coliforms, fecal coliforms, *Clostridium sulfite reducer*, fungi and yeasts), physical-chemical (pH, acidity and capacity of retention of water) and sensorial (color and odor). To evaluate the previous parameters a design of blocks it was used at random with factorial arrangement 4X2, using as blocks the days of evaluation. However, for the sensorial variables, analysis of variance was performed univariate.

*L. plantarum* showed susceptibility to Dicloxacilin, Ciprofloxacin and Penicillin; and it inhibited the pathogenic strains, but their raw extract it didn't inhibit to *C. perfringens*; it was observed growths of  $1.58 \times 10^{12}$ ,  $2,50 \times 10^{12}$  and  $3,14 \times 10^{12}$  UFC/mL for pH 2, 4.5 and 7 respectively, and  $5.2 \times 10^{13}$  and  $3.0 \times 10^{13}$  UFC/mL for 38 and 45°C. *Lactobacillus lactis*

presented resistance to Dicloxacilin and Cefalothin; and it inhibited to *E. coli* and *C. perfringens*, and the raw extract it included *S. aureus*; a growth  $1.1 \times 10^{11}$ ,  $2.1 \times 10^{10}$  and  $1.0 \times 10^{10}$  CFU/ml pH 2, 4.5 and 7 respectively, and  $1.2 \times 10^{13}$  and  $2.0 \times 10^{13}$  CFU/mL for 45 and 38°C was obtained.

Was found the péptide VAL-TIR-VAL in both lactic strains by means of HPLC procedure. For the bioconservation it was not interaction among the factors for none of the variables ( $p > 0.05$ ). The results, for total coliforms in the conservation additive factor, didn't show significant statistical differences ( $p > 0.05$ ), but if in the temperature factor, with a bigger growth in loins without refrigerating ( $p < 0.05$ ). In fecal coliforms it was observed differences in both factors (conservation additive and temperature) ( $p < 0.05$ ). Sulphite reducer Clostridium showed absence of the pathogens. It was only observed growth of molds and yeasts in the day fifteen with a range of 10 to 88 UFC. The pH didn't show significant differences in the conservation additive factor ( $p > 0.05$ ), but the temperature factor showed higher pH for the refrigerated loins ( $p < 0.05$ ).

Moreover, the acidity indicated differences in the factor conservation additive ( $p < 0.05$ ), with higher values for *L. plantarum* (0.097%) in comparison with the lactic acid (0.088%) and the control (0.088%). In the conservation temperature factor, it was smaller values in loin without refrigerating ( $p < 0.05$ ; 0.084%). The treatments had a bigger influence on the odor than in the color. It was observed that the addition of lactic acid affects the odor statistically from the first day (day 0), equal result, was observed with *L. lactis* without refrigeration. On the other hand, for the variable color, the loins without preservative went unacceptable on day 15 and the loins with *L. plantarum*, on day 7 ( $p < 0.05$ ), both exposed ones to ambient temperature.

It is concluded that *L. lactis* and *L. plantarum* show bioconservative behavior in pig loin; with bigger effectiveness of *L. plantarum*.

## CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCIÓN .....	18
1. OBJETIVOS.....	20
1.1 Objetivo General.....	20
1.2 Objetivos Específicos.....	20
2. HIPÓTESIS .....	21
2.1 Hipótesis Nula.....	21
2.2 Hipótesis Alternativa .....	21
3. MARCO TEÓRICO .....	22
3.1 Carne de cerdo .....	22
3.1.1 Cortes comerciales del cerdo .....	22
3.1.2 Inocuidad alimentaria .....	23
3.1.3 Calidad de la carne .....	25
3.1.3.1 Microorganismos que afectan la calidad de la carne .....	26
3.1.4 Métodos de conservación en alimentos .....	27
3.1.5 Bioconservación .....	28
3.1.5.1 Ingredientes naturales para la industria alimentaria .....	28
3.1.5.2 Bacterias Ácido- Lácticas (BAL) y Bacteriocinas. ....	30
4. DISEÑO METODOLÓGICO .....	32
4.1 Localización zona de estudio .....	32
4.2 Cepas.....	32
4.2.1 Reconstitución, siembra y cultivos de bacterias lácticas y patógenas. ....	32

4.2.2 Poder antagónico de antibióticos frente a cepas de estudio .....	33
4.2.3 Prueba de inhibición in vitro y evaluación de sobrenadantes .....	33
4.2.3.1 Método de difusión con discos de agar MRS .....	33
4.2.3.2 Difusión en cilindro y con sensidiscos utilizando el sobrenadante .....	33
4.2.3 Capacidad de producción de gas y actividad de catalasa en las cepas lácticas. ....	34
4.2.4 Evaluación de la resistencia de BAL a varios pH .....	34
4.2.5 Efecto de la temperatura de crecimiento sobre la viabilidad de BAL .....	34
4.2.6 Cinética de crecimiento de las BAL .....	35
4.2.6.1 Técnica de conteo en placa (UFC/ml) .....	35
4.2.6.2 Valoración del pH durante la cinética de fermentación .....	35
4.2.6.3 Cuantificación del consumo de azúcar total por BAL .....	36
4.2.6.4 Estimación del ácido láctico generado por BAL .....	36
4.2.6.5 Análisis de proteína .....	36
4.2.6.7 Determinación de péptidos por HPLC. ....	37
4.2.6.7 Efecto de la aplicación del sobrenadante de las BAL sobre la bioconservación de lomo de cerdo .....	37
4.3 Diseño Experimental .....	39
4.3.1 Análisis de varianza con prueba de Fisher LSD para análisis sensorial .....	39
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	40
5.1 Prueba de antibióticos .....	40
5.2 Inhibición in vitro de las cepas lácticas .....	41
5.3 Inhibición in vitro del sobrenadante de las bal bajo 2 metodologías .....	42
5.4 Pruebas de catalasa y gas .....	44
5.5 Pruebas de viabilidad a diferentes ph y temperatura .....	44

5.6 Cinética de fermentación .....	45
5.7 Péptidos en el sobrenadante. ....	49
5.8 Bioconservación.....	51
6. CONCLUSIONES .....	64

**LISTA DE TABLAS**

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Composición nutricional del lomo de cerdo.....	23
Tabla 2. Tratamientos para bioconservación.....	38
Tabla 3. Prueba in vitro de <i>Lactobacillus plantarum</i> y <i>Lactobacillus lactis</i> .....	41
Tabla 4. Crecimiento de BAL a diferentes pH. ....	45
Tabla 5. Crecimiento de las BAL a diferentes temperaturas.....	45
Tabla 6. Resumen cinética de fermentación.....	48
Tabla 7. Resultados péptidos en sobrenadante. ....	49
Tabla 8. Mezcla de péptidos patrón.....	50
Tabla 9. Valores promedio para el factor aditivo. ....	52
Tabla 10. Valores promedio el factor temperatura. ....	52
Tabla 11. Valores encontrados para la prueba de <i>Clostridium sulfito reductor</i> . Mohos y levaduras. <i>Listeria sp.</i> y antibióticos. ....	53
Tabla 12. Límite de aceptabilidad de los tratamientos evaluados .....	60

**LISTA DE CUADROS**

	<b>Pág.</b>
Cuadro 1. Poder antagónico de antibióticos comerciales frente a cepas de estudio. ....	40
Cuadro 2. Halos de inhibición del sobrenadante de <i>L. plantarum</i> en las bacterias patógenas. ....	42
Cuadro 3. Halos de inhibición del sobrenadante de <i>L. lactis</i> sobre las bacterias patógenas.....	43

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Cinética de crecimiento de <i>L. plantarum</i> proteína, azúcar, pH y acidez en el medio MRS. ....	46
Figura 2. Cinética de fermentación. pH. azúcar. acidez y proteína de <i>L. lactis</i> en medio MRS. ....	47
Figura 3. Resultados de la cromatografía de los péptidos presentes en <i>L. plantarum</i> . ....	51
Figura 4. Resultados de la cromatografía de los péptidos presentes en <i>L. lactis</i> . ....	51
Figura 5. Variable acidez de la carne. ....	57
Figura 6. Variable capacidad de retención de agua. ....	58
Figura 7. Variable pH. ....	59
Figura 8. Gráfico de radar para color. ....	61
Figura 9. Gráfico de radar variable olor. ....	62



**LISTA DE ANEXOS**

	<b>Pág.</b>
Anexo A. Instrucciones de uso para microorganismos KWIK-STIK™ .....	74
Anexo B. Método de Dubois.....	75
Anexo C. Curva patrón para determinación de azúcares totales (método de antrona) .....	78
Anexo D. Lecturas de absorbancia para el consumo de azúcar total de las dos cepas .....	80
Anexo E. Análisis estadístico.....	81
Anexo F. Artículos y ponencias.....	97

## INTRODUCCIÓN

La inocuidad alimentaria es una de las principales preocupaciones de los consumidores, es por ello que se requiere sistemas adecuados de conservación que permitan generar productos seguros y de calidad, teniendo en cuenta que para incrementar la vida útil de los alimentos, se debe llevar a cabo varias prácticas que en ocasiones generan incrementos en los costos de producción de los mismos; tal es el caso de la carne, considerada como un alimento perecedero de alto valor nutricional.

La bioconservación es una alternativa a considerar dentro de la industria de los alimentos, puesto que la tendencia hacia el consumo de alimentos saludables está en aumento. Las bacterias ácido lácticas calificadas como seguras en el consumo humano se han probado en diferentes procesos tecnológicos alimentarios, bien sea como preservantes naturales en algunos casos, o como aceleradores en procesos fermentativos o como probióticos, contribuyendo al buen mantenimiento de la salud de los consumidores. Su aplicación utilizando procesos biotecnológicos busca evaluar su efectividad para elegir el mejor método de aplicación.

Partiendo de lo anterior, se eligió para este estudio la carne de cerdo puesto que es apetecida por los consumidores, en especial un corte con valor comercial considerable, se pretendió mediante esta investigación determinar el efecto del sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus lactis* sobre *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium perfringens*, y *Staphylococcus aureus* como método de bioconservación de lomo (*Longissimus dorsi*) de cerdo.

Para ello se llevó a cabo una serie de procesos biotecnológicos que permitieron establecer el posible efecto inhibitorio de las bacterias ácido lácticas (BAL) sobre las patógenas y probarlas para determinar la bioconservación del lomo de cerdo; esto utilizando cepas de colección ATCC de las bacterias anteriormente mencionadas. Con el fin de cumplir los objetivos de la

investigación, se realizó diseños experimentales, que permitieron establecer la cinética de crecimiento de las BAL, se aplicó un diseño de bloques con medidas repetidas en el tiempo para cinética de fermentación; así mismo, se evaluó el efecto bioconservante mediante un diseño factorial en bloques al azar, de otro lado, se realizó una caracterización de los sobrenadantes mediante técnicas analíticas de HPLC (cromatografía líquida de alta definición) y unas pruebas descriptivas complementarias; en el caso de los diseños experimentales se ejecutó análisis estadísticos en paquete S.A.S.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo General

Evaluar el efecto del sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus lactis* sobre *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium perfringens*, y *Staphylococcus aureus* como método de bioconservación del lomo (*Longissimusdorsi*) de cerdo

### 1.2 Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto in vitro del *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus lactis* sobre *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* y *Clostridium perfringens*.
- Estudiar los mejores parámetros de la cinética de fermentación de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus lactis*, en el medio comercial MRS.
- Probar el efecto bioconservante sobre lomo de cerdo empacado al vacío del sobrenadante obtenido de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus lactis* a temperatura ambiente y de refrigeración, y realizar la caracterización mediante técnicas analíticas de HPLC (cromatografía líquida de alta definición).

## **2. HIPÓTESIS**

### **2.1 Hipótesis Nula**

El sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus lactis* no tendrá efecto sobre *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium perfringens*, y *Staphylococcus aureus*, como método de bioconservación de lomo (*Longissimus dorsi*) de cerdo.

### **2.2 Hipótesis Alterna**

El sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus lactis* tendrá efecto sobre *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium perfringens*, y *Staphylococcus aureus*, como método de bioconservación de lomo (*Longissimus dorsi*) de cerdo

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Carne de cerdo

La carne constituye la parte muscular comestible de los animales de abasto sacrificados en plantas de sacrificio autorizadas. Está conformada por los tejidos que rodean el esqueleto, tendones, vasos, nervios, aponeurosis y todos los tejidos no separados durante la faena (Quiroga, 2005).

La carne de cerdo es un alimento de excelente calidad, ya que posee magníficas propiedades nutricionales, tiene un porcentaje de proteína del 18.9 y lípidos del 13.5%; de los cuales, el 48% contiene ácidos grasos monoinsaturados. El aporte de vitaminas del grupo B es excelente, con casi 10 veces más vitaminas B1 que otras carnes, es la carne de mayor consumo en el mundo y en 2011 tuvo un volumen de producción de 100.9 millones de toneladas; valor que representó el 43% del total de las carnes consumidas en Colombia. En cuanto al consumo per cápita, los valores más altos se observan en los países asiáticos y europeos; con un mayor consumo en Hong Kong (72,1 kg por persona/año) (Asociación Colombiana de Porcicultores 2012).

Su demanda es amplia a nivel mundial y representa el 81.2% de la producción de carne consumida en cuatro regiones de mundo: China, Unión Europea, Federación de Rusia y Estados Unidos (ACP-FNP, 2012).

##### 3.1.1 Cortes comerciales del cerdo

Una canal de cerdo se puede dividir a la mitad y de cada media canal, se obtiene 3 grandes cortes: pierna, brazuelo y costado; dando como resultado el doble de cada pieza obtenida (2 piernas, 2 brazuelos, entre otros) (Arboleda, 2011).

- **Lomo**

- 1). Nombre científico: *Longissimus dorsi*

- 2). Nombre común: lomo, cañón, chuleta de lomo, lomo fino, cinta de lomo, pluma.
- 3). Descripción: el cañón es el corte del cerdo de mayor valor comercial, contiene gran cantidad de humedad (90% aprox.) y es muy poco utilizado en la industria de las carnes frías, por su alto valor comercial (tabla 1) (Arboleda, 2011).

**Tabla 1.**

***Composición nutricional del lomo de cerdo.***

<b>Energía</b>	<b>Grasa</b>	<b>AGS</b>	<b>AGMS</b>	<b>AGPI</b>	<b>Colesterol</b>
<b>(Kcal)</b>	<b>(g)</b>	<b>(g)</b>	<b>(g)</b>	<b>(g)</b>	<b>(mg)</b>
236	14.3	5.5	6.5	1,6	75

Composición nutricional por cada 100 gramos de alimento

(Aranceta, 2001).

AGS: Ácidos grasos saturados, AGMS: Ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: Ácidos grasos poli-insaturados.

### ***3.1.2 Inocuidad alimentaria***

La inocuidad alimentaria es un reto que afronta la industria de alimentos en la actualidad. La creciente población mundial determina el crecimiento en la demanda de alimentos, impulsada por naciones como India o China. Según datos de la OMS (Organización Mundial de la Salud), cerca de 200 millones de personas se enferman todos los años debido al consumo de alimentos inseguros y se estima que 1.5 millones de niños pierden la vida cada año por enfermedades relacionadas con la diarrea, atribuidas a contaminaciones alimentarias y del agua (Hazen, 2013).

La responsabilidad primaria por la inocuidad alimentaria recae sobre los productores, procesadores y comercializadores de alimento. Tienen como obligación asegurar la inocuidad de los productos y satisfacer los requerimientos de las leyes alimentarias. Por ello es importante, que

los esfuerzos estén encaminados a identificar puntos críticos en toda la cadena de producción-procesamiento-distribución (Ramírez-Romero *et al.* 2013).

La inocuidad es un factor que puede ser alterado durante las fases de procesamiento, almacenamiento y distribución; Por lo anterior, es importante que todos los eslabones de la cadena aseguren la calidad de los productos. Esto conlleva a comprender la importancia de aplicar las medidas de bioseguridad en los diferentes procesos de almacenamiento y transformación de la carne, que permitan mantener la higiene e inocuidad del producto. Los procesos de conservación como la cadena de frío y otros suplementarios hacen parte de la prolongación o mantenimiento de la vida útil, pero un apropiado sistema de análisis de puntos críticos de control garantiza la calidad de los productos.

En Colombia, el sistema de inspección, vigilancia y control en la cadena alimentaria cárnica está dirigido por entidades gubernamentales; la primera es el ICA, que inspecciona los establecimientos dedicados a la comercialización de animales en pie (del centro de producción hasta la planta de beneficio). Cuando los animales ingresan a la planta de beneficio, entra en acción la segunda entidad gubernamental, que es el INVIMA, quien realiza inspección de la calidad de la canal faenada; y por último los Entes Territoriales de Salud, quienes inspeccionan la carne y derivados cárnicos desde que sale de la planta de beneficio hasta el consumidor final (ICA 2010).

La inocuidad es un factor importante para los mercados nacionales e internacionales, ya que se exige que el producto cárnico tenga no solo el abastecimiento de alimentos de calidad nutricional; sino que estos sean sanos o inocuos para el consumidor. Para lograr este objetivo el ICA ha diseñado una serie de estrategias fundamentadas en la implementación de sistemas de aseguramiento de la calidad como son las buenas prácticas ganaderas (BPG), las buenas prácticas agrícolas (BPA) y las buenas prácticas de manufactura (BPM). Todas estas prácticas tienen como



objetivo gestionar el riesgo sanitario, biológico y químico en la producción primaria, contribuyendo con la competitividad de la cadena (ICA 2010).

### **3.1.3 Calidad de la carne**

La carne es el resultado de transformaciones bioquímicas del músculo luego del sacrificio del animal. Por lo tanto, esas transformaciones y las condiciones de almacenamiento rigen los futuros atributos sensoriales del alimento. La carne es una matriz compleja, donde conviven materia grasa, proteínas, minerales, vitaminas, etc., que dificultan el análisis del alimento como tal.” (Graziotti *et al.* 2014).

La carne, al igual que la mayoría de los alimentos, debe poseer características que la hagan apetecible al consumidor, por lo que deberá reunir una serie de requisitos enmarcados dentro del concepto de calidad (Sánchez *et al.*, 2008). La calidad constituye el conjunto de atributos o propiedades, que le imparten al producto las características necesarias para ser aceptado; dentro de estas, se pueden mencionar con igual grado de importancia la calidad nutricional, físico química, microbiológica y organoléptica (Rivera, 2004).

Además, la calidad de la carne se define generalmente en función de su calidad composicional (coeficiente magro-graso) y de factores de palatabilidad tales como aspecto, olor, firmeza, jugosidad, terneza y sabor (FAO, 2013).

En estos últimos años se ha observado que los consumidores otorgan mayor importancia a la calidad de los alimentos que consumen, interesándose no sólo por el valor nutritivo de los mismos sino por el grado de satisfacción y placer que los mismos les brindan. Es así que la elección de los alimentos se hace en función de su calidad o “grado de excelencia”, que comprende conceptos como valor nutritivo, aspecto, textura, aroma y sabor, siendo relevantes también su naturaleza, origen, sistemas y procesos de producción, carácter artesanal, método de preservación y aseguramiento de sus características específicas.” (Graziotti *et al.* 2014).

Muchos factores afectan la calidad e inocuidad de los productos cárnicos; entre estos encontramos los químicos, producto de la contaminación con sustancias externas; los biológicos, producto de la contaminación microbiológica, ya sea ambiental o de manipulación. Para ello se necesita desarrollar estrategias que minimicen el impacto de estos factores y aumente de forma indirecta la vida útil de los productos cárnicos. De los anteriores factores, el que interesa para la presente investigación son los biológicos, ya que afectan de forma directa la calidad de producto final y su vida útil.

### ***3.1.3.1 Microorganismos que afectan la calidad de la carne***

Los microorganismos que alteran la carne, llegan a ella por infección del animal vivo (contaminación endógena) o por invasión posmortem (contaminación exógena); esta última es la más frecuente (Arango y Restrepo, 2001). Los mismos autores destacan la presencia de microorganismos, que se conservan después del sacrificio, algunos provenientes del suelo, aire y agua. Se han encontrado valores de 101-105 mesófilos aerobios por centímetro cuadrado. La contaminación más común son bastones Gram-negativos y micrococos, incluidas *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Flavobacterium* spp., bacterias productoras de ácido láctico, hongos, levaduras y virus entéricos en bajas cantidades (Vallejo *et al.* 2014). Igualmente, sobre la superficie de la carne se pueden encontrar mohos de los generos *Cladosporium*, *Sporotrichum*, *Oospora*, *Thamnidium*, *Mucor*, *Penicillum*, *Alternaria*, *Chaetostylum*, *Rhizopus* y *Monillia* y las levaduras *Candida*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Torulopsis*.

Existe un amplia variedad de microorganismos que afectan la calidad de la carne, pero, los más importantes son aquellos que causan toxi-infecciones alimentarias en el consumidor, dichos agentes pueden ser: *Salmonella* spp., *E. coli* enterohemorrágico, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum* y *Bacillus cereus* (Sánchez *et al.* 2008).

Se puede encontrar microorganismos indeseables por refrigeraciones insuficientes, tales como: *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterolítica*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* y aquellos presentes en el ambiente que pueden llegar al alimento por contaminación cruzada; es el caso de *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Shigellas* pp (Arango y Restrepo, 2001).

### **3.1.4 Métodos de conservación en alimentos**

La conservación en los alimentos es fundamental para mantener su inocuidad, de manera que el consumidor no corra riesgos. Para ello, se requiere el uso de diversos métodos, entre los cuales se destacan: tratamiento térmico, refrigeración, congelación y conservantes químicos; dichos tratamientos, en algunos casos, producen cambios en las propiedades organolépticas de los productos, lo cual no es de agrado para el consumidor; además, dependiendo de su eficiencia, varía la vida útil en anaquel. Estos productos se consideran efectivos, ya que inhiben algunos microorganismos, sin embargo, algunos psicótrofos como la *Listeria monocytogenes*, pueden crecer a temperaturas de refrigeración (4°C), debido a esto, la industria alimentaria ha optado por el uso de dióxido de sulfuro, sulfitos, parabenos, ácido acético, ácido láctico, ácido propiónico, ácido benzoico, ácido sórbico, nitritos y nitratos (Haase *et al.* 2014)

La carne es uno de los alimentos perecibles de mayor importancia en la canasta familiar, por tanto, se ha recurrido a la utilización de diversos métodos de conservación, como es el empaque al vacío, acompañado o no de atmósferas controladas o modificadas. En este caso, se debe eliminar el aire al interior del sistema y dado el caso, la inclusión de un gas o mezcla de gases (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, entre otros), además, se puede incluir sustancias bioactivas que permitan mejorar las condiciones de conservación, generando un envasado activo que tiene por finalidad incrementar el tiempo de conservación de los alimentos y preservar o potenciar sus propiedades organolépticas, para ello, se pueden liberar sustancias antimicrobianas, antioxidantes y aromas,

entre otros. (Membre *et al.* 2007)

### **3.1.5 Bioconservación**

La conservación de la carne es, sin duda alguna, imprescindible, ya que su vida útil puede ser limitada. Al considerarse como uno de los alimentos más perecederos, su deterioro se debe a la actividad acuosa ( $A_w$ ) y al contenido de humedad relativa; la primera, constituye la relación entre la fugacidad del agua en la carne y en el agua pura a la misma temperatura, llegando a valores iguales o mayores a 0.99, esto está relacionado directamente con la proliferación bacteriana; la segunda, por su parte, alcanza valores próximos a 60% y se relaciona con el crecimiento bacteriano (Arango y Restrepo, 2001).

Las formas de conservación posteriores al sacrificio deben ser adecuadas y oportunas, con el fin de prevenir o retrasar cambios que afecten su calidad, estos cambios pueden ser de tipo físico, químico o microbiológico (Sánchez *et al.* 2008). Los factores que influyen en el crecimiento de los microorganismos en las carnes son: la actividad de agua ( $A_w$ ), el potencial de óxido-reducción (Eh), el pH, las necesidades nutritivas y la temperatura (Arango y Restrepo, 2001).

Una forma de prolongar la vida útil de la carne, es la aplicación de ciertas sustancias como los biopreservantes con capacidad de inhibir agentes patógenos. La biopreservación es un método de conservación que utiliza microorganismos, como algunos géneros de bacterias ácido lácticas y sus productos (peróxido de hidrogeno, reuterina, acetaldehído), con el fin de extender la vida útil y aumentar la inocuidad de los alimentos (Vanegas *et al.*, 2011).

#### **3.1.5.1 Ingredientes naturales para la industria alimentaria**

Alimentarse en el siglo XXI no resulta tarea fácil, el consumidor ha tomado posiciones en cuanto a la elección, siendo un factor predominante el sabor del producto, seguido por el cuidado de la salud a través de los ingredientes, sin querer sacrificar su tiempo, por lo que busca alimentos fáciles de preparar.

La tendencia al consumo de alimentos saludables, se divide en bajos en grasa o ligeros, frescos, biológicos, naturales y funcionales. De acuerdo con investigaciones realizadas en 2012, en Estados Unidos, el 90% de los consumidores prefirió este tipo de alimentos por la preocupación de mantener el peso corporal balanceado (Kiu, 2012).

La industria alimentaria se preocupa constantemente por incursionar en la utilización de diversos ingredientes naturales (antioxidantes: aceite de tomillo, aceite de orégano), que cumplan las funciones de los químicos (antioxidantes, agentes esenciales, etc.) para que estos puedan ser sustituidos. Los productos cárnicos derivados en sus formulaciones llevan gran cantidad de aditivos químicos, que determinan en cierto grado sus propiedades; dichos aditivos, pueden ser tóxicos e incluso cancerígenos cuando se utilizan de manera inadecuada; tal es el caso de los nitritos. La norma técnica colombiana 4565 describe el procedimiento para determinar el contenido de nitritos en carne y productos cárnicos como método de referencia (ICONTEC, 2010).

Al respecto, se han llevado a cabo algunos estudios de bioconservación con proteínas o compuestos de naturaleza peptídica, producidas por bacterias (bacteriocinas), ranas (magainins), insectos (cecropins) y mamíferos (defensinas) (Culebras, 2004).

Una característica común entre estos agentes es su composición proteica y la actividad antimicrobiana (efecto bactericida o bacteriostático), que consiste en la inhibición del crecimiento de ciertos agentes patógenos (Palanca, 2006). A pesar de las claras diferencias en la genética (eucariotas vs procariontas) de estos agentes inhibidores, existen similitudes definitivas de la actividad biológica, que se refiere a su estructura molecular (Farjas, 2003).

Algunas de las especies de *Lactobacillus* de importancia en la industria alimentaria son, el *L. acidophilus*, por sus efectos en la disminución de concentraciones de colesterol en el plasma sanguíneo, *L. plantarum*, *helveticus* y *reuteri*, que se les atribuye propiedades benéficas para la

flora intestinal (Rodríguez, 2011).

No obstante, en 1965 apareció el término probiótico. En este tiempo se definía así a cualquier sustancia u organismo que contribuyera al balance microbiano intestinal principalmente de los animales de granja. Tiempo después se trató de enfatizar que era un suplemento microbiano vivo. Actualmente son definidos como organismos vivos que al ingerirse en ciertas cantidades ejercen beneficios para la salud. En el caso de incluirlos en la dieta alimentaria participan en la reconstrucción de la flora intestinal, debido a su pérdida por tratamientos antibióticos y/o problemas de infecciones intestinales que ocasionan síntomas de diarrea (Maldonado-Lozano 2014).

### **3.1.5.2 Bacterias Ácido- Lácticas (BAL) y Bacteriocinas.**

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son conocidas por sus propiedades acidificantes y su aplicación en la fermentación de los alimentos, están ahora comenzando a ser reconocidas para la producción de bacteriocinas. La aplicación generalizada de BAL en los alimentos cultivados/fermentados (madurados), su reconocimiento como seguros para el grado alimenticio de los organismos y su presencia como parte de la flora intestinal humana, ha facilitado la aplicación de las bacteriocinas como agentes antimicrobianos en los alimentos. Las bacteriocinas de las BAL podrían ser más aceptables que los péptidos antimicrobianos de otras fuentes, sin embargo, son sobre todo eficaces contra microorganismos gram positivos y en cierta medida, sobre bacterias Gram-negativas, hongos y protozoos (Fernández-Villa *et al.* 2014).

Las bacteriocinas o biocinas son sustancias de naturaleza peptídica producidas por las bacterias ácido lácticas (Vasquez *et al.*, 2009). Se emplean como productos antimicrobianos, bacteriocinas o uso directo de géneros como *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*. Se constituye en una alternativa para la biopreservación de productos mínimamente procesados, que son mantenidos bajo refrigeración (Prasad *et al.* 2013). Otros géneros como *Lactobacillus*, son

utilizados como cultivos probióticos, que tienen características similares de biopreservación. Dentro del grupo de las BAL, se mencionan grupos de amplia importancia como: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Tetragenococcus* (Jurado, 2010).

La información sobre los péptidos antimicrobianos de varias fuentes pueden proporcionar una mayor comprensión de su modo de acción y facilitar su aplicación como "bioconservantes" en los alimentos, tal es el caso de la Nisina presente en el *L. Lactis* y la plantaricina en el *L. plantarum*, cuya aplicación se ha probado en la producción de alimentos como un aditivo en productos lácteos para prevenir la descomposición ocasionada por bacterias Gram positivas, especialmente de los Géneros *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Listeria* (Terrence y Freedon 2005).

## 4. DISEÑO METODOLÓGICO

### 4.1 Localización zona de estudio

Los análisis fueron realizados en San Juan de Pasto, en la Universidad de Nariño, en el Laboratorio de microbiología del Grupo de Investigación FISE-PROBIOTEC, del departamento de Producción y Procesamiento Animal de la Facultad de Ciencias Pecuarias, con una temperatura promedio de 14°C, una altura de 2540 msnm, precipitación anual promedio de 1084 mm y humedad relativa del 76% (IDEAM 2014).

### 4.2 Cepas

Se usaron cepas de *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014, *Lactobacillus lactis* ATCC® 11454, *Escherichia coli* ATCC® 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC® 25241, *Clostridium perfringens* ATCC® 13124 y *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923.

#### 4.2.1 Reconstitución, siembra y cultivos de bacterias lácticas y patógenas.

La reconstitución de cada cepa se efectuó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para su conservación se realizaron repiques en medio sólido y líquido cada 5 y 8 días respectivamente, se usó medios MRS para las cepas lácticas, mientras que para las cepas patógenas se usó caldo BHI como medio líquido y como medio sólido agar McConkey para *E. coli*, agar XLD para *S. typhimurium*, agar SPS para *C. perfringens* y agar Baird Parker para *S. aureus*. Las cepas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas, luego, refrigeradas a 4°C hasta su utilización.

Para obtener el inóculo de *L. plantarum* y *L. lactis*, se realizó el siguiente procedimiento, de forma independiente para cada cepa láctica: se tomó un Erlenmeyer y se depositó 40 ml de caldo MRS estéril, en este, se colocó una alícuota de la cepa láctica y se incubó a 35°C por 24 horas, al terminar el periodo de incubación se tomaron 4 ml del Erlenmeyer y se depositaron en otros 40 ml de caldo MRS, este último se incubó en las condiciones mencionadas anteriormente.



El ajuste del inóculo se realizó mediante la metodología propuesta por Crueger y Crueger (1993), para ello se tomó 90 ml de caldo MRS estéril y se adicionó 10 ml de *L. plantarum* de acuerdo con la regla; luego de incubado, se tomó 1 ml y se realizó lectura directa en espectrofotómetro a 625 nm. En los casos donde la población fue superior a la establecida se adicionó caldo estéril (Tagg y McGiven 1971, Estrada *et al.* 2005).

#### **4.2.2 Poder antagónico de antibióticos frente a cepas de estudio**

Se probó el efecto causado por los antibióticos cefalotina (KF 30 µg), dicloxacilina (DCX 1 µg), cefepime (FEP 30 µg), penicilina (GP 10 UI), ciprofloxacina (CIP 5 µg) y gentamicina (CN 10 µg). Para ello se usó el método de Kirby Bauer modificado (1966), cabe resaltar que la selección de los antibióticos se hizo de acuerdo a la frecuencia de uso en enfermedades producidas por los patógenos *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus* (Sumano y Ocampo. 1993).

#### **4.2.3 Prueba de inhibición in vitro y evaluación de sobrenadantes**

##### **4.2.3.1 Método de difusión con discos de agar MRS**

Para ello se utilizó la metodología propuesta por Tagg y McGiven (1971) adecuada a las condiciones del laboratorio. Se tomaron alícuotas de cada bacteria patógena y fueron ajustadas a escala MacFarland 0.5, se colocaron en cajas de petri con agar Müeller Hinton; en cada caja se depositaron discos impregnados con *L. plantarum* a concentraciones de 25, 50 y 100 µl, las cajas fueron incubadas a 32°C por 24 horas, halos iguales o superiores a 2 mm se consideraron como indicio de susceptibilidad (Estrada *et al.* 2005). Para obtener los discos de la bacteria láctica, se ajustó a 0.5 en escala McFarland y se colocó en cajas de petri que contenían agar MRS en las concentraciones requeridas y se incubaron a 32°C durante 24 horas.

##### **4.2.3.2 Difusión en cilindro y con sensidiscos utilizando el sobrenadante**

Para ello se usó el método de Kirby Bauer (1966). Se realizó el ajuste de la bacteria

láctica a 1 en la escala MacFarland, se tomaron muestras de 1.5 ml y se depositaron en tubos Eppendorf, finalmente se centrifugaron a 15000 rpm y 4°C de temperatura, por 15 minutos. El centrifugado se obtuvo de dos formas, el primero sin filtrar y el segundo filtrado (papel filtro 0.25 µm), enseguida se conservaron en refrigeración (4°C) hasta su análisis. La evaluación del sobrenadante se realizó utilizando dos metodologías: discos de papel pads (sensidiscos) y cilindros plásticos que se colocaron sobre las cajas de petri y se incubaron en las mismas condiciones propuestas para inhibición con *L. plantarum*. Las concentraciones evaluadas fueron de 50, 75 y 100 µl para cada método (Jurado-Gómez et al. 2013). Se tomó como medida de susceptibilidad, halos de inhibición mayores o iguales a 2 mm (Estrada *et al.* 2003).

#### **4.2.3 Capacidad de producción de gas y actividad de catalasa en las cepas lácticas.**

**Se siguió** la metodología propuesta por Cai *et al.* (1999). Para determinar la producción de gas, se cultivó por separado las cepas lácticas en caldo MRS con 5% de glucosa en tubos de ensayo que contenían en su interior tubos Durham, luego se determinó la presencia de burbujas dentro de los tubos. Así mismo, se aislaron cultivos sólidos de las cepas en medio MRS y se adicionó peróxido de hidrogeno; la producción de burbujas en ambas pruebas se determina como positiva.

#### **4.2.4 Evaluación de la resistencia de BAL a varios pH**

Se evaluó si las cepas lácticas son viables a pH 2.5, 4.5 y 7, por un periodo de 3 horas, con mediciones cada hora. Para ello, se usó medio MRS comercial y el pH fue ajustado con ácido tartárico, las condiciones de incubación fueron de 32°C y 48 horas.

#### **4.2.5 Efecto de la temperatura de crecimiento sobre la viabilidad de BAL**

Para ello, se determinó la fase exponencial de crecimiento de cada cepa láctica y con base en el tiempo de presentación de la fase, se evaluó dos temperaturas (38 y 45°C) en el medio MRS. Se usó el procedimiento descrito por Crueger y Crueger (1999), para ello se ajustó el

inóculo a 0.125 en escala de McFarland y se incubó 12:00 horas, luego se hicieron diluciones de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-12}$  con agua peptonada y se sembró en cajas de petri con azul de anilina y se inició en la dilución  $10^{-8}$  hasta  $10^{-12}$  a  $37^{\circ}\text{C}$  y 48 horas, determinando el recuento de UFC/ml.

#### ***4.2.6 Cinética de crecimiento de las BAL***

El cultivo del inóculo se realizó en el medio comercial MRS, para ello, antes de iniciar, se verificó la pureza de la cepa mediante coloración de GRAM y se siguió la metodología propuesta por Crueger y Crueger (1999), aislando primero colonias puras y luego depositando una alicuota en 40 ml de caldo MRS estéril (cada cepa por separado) en erlenmeyers de 125 ml, posteriormente, se incubaron a  $32^{\circ}\text{C}$  por 24 h, de estos nuevamente se transfieren 4 ml a 40 ml de caldo MRS estéril y se incubaron bajo las mismas condiciones. Realizado el ajuste correspondiente y ya preparado el inóculo para iniciar la cinética, se incubó en incubadora shaker en agitación constante a 100 rpm y a  $32^{\circ}\text{C}$ . Se tomó muestras cada 2 h 24 min durante 24 h y se evaluó conteo de microorganismos en placa, pH y acidez, así mismo se tomaron muestras para la determinación posterior del consumo total de azúcares.

##### ***4.2.6.1 Técnica de conteo en placa (UFC/ml)***

El conteo de microorganismos viables en placa se determinó mediante la disolución de 1 ml de muestra en 9 ml de agua peptonada al 0.1%, se realizó diluciones decimales que fueron transferidas a cajas de Petri, que contenían medio MRS con azul de anilina (0.1 ml) para siembra en superficie. Las cajas fueron incubadas a  $32^{\circ}\text{C}$  y se observaron entre 24 y 48 h. Se tuvo en cuenta únicamente las cajas de Petri con conteos entre 30 y 300 colonias. El número de colonias fue multiplicado por el inverso de la dilución y por 10 para obtener UFC/ml (Ramírez 2005).

##### ***4.2.6.2 Valoración del pH durante la cinética de fermentación***

El pH se determinó con un pHmetro digital (JENCO® VisionPlus).

#### 4.2.6.3 Cuantificación del consumo de azúcar total por BAL

Con el fin de cuantificar el consumo de azúcar total por parte de las bacterias probióticas durante la cinética y establecer la relación consumo/crecimiento celular, se determinó la cantidad de los azúcares totales (mg) mediante el método de Dubois (1956); conocido como método de antrona. Para ello, inicialmente se realizó una curva patrón de una solución de glucosa, haciendo lecturas en espectrofotómetro ajustado a una longitud de onda 625 nm, cuyos valores de absorbancia se grafican contra la concentración en miligramos. Posteriormente se realizó el mismo procedimiento descrito, pero con las muestras donde se obtuvo el consumo total de azúcar (mg), mediante la utilización de la ecuación de la recta  $y = mX + b$ .

#### 4.2.6.4 Estimación del ácido láctico generado por BAL.

El ácido láctico fue determinado mediante titulación con hidróxido de sodio (1N) (LANARA 1981). La biomasa se determinó por los métodos de Crueger y Crueger (1999) y Rodríguez *et al.* (2003), para ello se estableció la velocidad máxima de crecimiento mediante la siguiente ecuación:

$$V_{max} = \frac{dLnX}{dt}$$

dLnX = derivada del crecimiento celular expresada en logaritmo.

dt = derivada del tiempo.

Y el tiempo de duplicación celular (td), se determinó teniendo en cuenta:

$$td = \frac{Ln2}{v_{max}}$$

#### 4.2.6.5 Análisis de proteína

La proteína se determinó con el método de Lowry *et al.* (1951) modificado, se obtuvo una curva patrón a partir de seroalbúmina bovina, luego se midió la absorbancia en espectrofotómetro

a 625 nm. La concentración fue graficada contra los valores para obtener la ecuación de la línea recta.

$$y = mX + b$$

y= absorbancia

m= pendiente de la recta

X = variable (concentración proteína)

b = termino independiente

#### ***4.2.6.7 Determinación de péptidos por HPLC.***

Se tomó una muestra de sobrenadante de *L. plantarum* y otra de *L. lactis* y se determinó el contenido de péptidos por espectrofotometría de alta densidad (HPLC), se usó una alícuota de 25 ml de sobrenadante, la cual fue centrifugada a 18000 rpm, por 30 minutos y 4 °C; luego se filtró 2 ml en jeringa de filtrar (0.25 micras) y finalmente fue llevado a lectura en el espectrofotómetro a 650 nm y se obtuvo los resultados.

#### ***4.2.6.7 Efecto de la aplicación del sobrenadante de las BAL sobre la bioconservación de lomo de cerdo***

Con el fin de evaluar el efecto bioconservante de las cepas lácticas sobre el lomo de cerdo, se obtuvo el sobrenadante de las BAL, de acuerdo con la fase logarítmica de crecimiento encontrada durante la cinética de fermentación. El inóculo se centrifugó a 12000 rpm, con una temperatura de 4°C y un tiempo de 15 min. Luego, se llevó a un pH cercano a 6, mediante la neutralización con NaOH (0,1 N) y finalmente se calentó a una temperatura de 80°C. El sobrenadante se suministró a razón de 500 µL inyectados y por aspersion sobre cada pieza de lomo. Se utilizó 50 g de lomo de cerdo para cada réplica y se aplicó un tiempo de exposición de 24 horas empacado al vacío; posteriormente, los lomos fueron distribuidos a dos diferentes

temperaturas (ambiente y refrigeración), y se mantuvieron por un periodo de 15 días (Vásquez *et al.* 2009). Como tratamientos testigos se utilizaron ácido láctico comercial (2%) y lomo de cerdo sin conservar. De esta manera, se evaluaron 4 niveles de conservación: sin conservante, ácido láctico, *L. lactis* y *L. plantarum*.

A los días 0, 7 y 15 se realizaron mediciones microbiológicas, físico químicas y sensoriales sobre los lomos. Las microbiológicas fueron: coliformes totales, coliformes fecales, *Clostridium* sulfito reductor, hongos y levaduras; las físico-químicas: pH, acidez y capacidad de retención de agua; las sensoriales: color y olor.

Los tratamientos para la bioconservación de lomo de cerdo se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2.**

***Tratamientos para bioconservación***

<b>Tratamiento</b>	<b>Bioconservante</b>	<b>T°</b>
<b>T1</b>	Lomo de cerdo sin aditivo	20°C
<b>T2</b>	Lomo de cerdo sin aditivo	4°C
<b>T3</b>	Lomo de cerdo con ácido láctico	20°C
<b>T4</b>	Lomo de cerdo con ácido láctico	4°C
<b>T5</b>	Lomo de cerdo con sobrenadante <i>L. lactis</i>	20°C
<b>T6</b>	Lomo de cerdo con sobrenadante <i>L. lactis</i>	4°C
<b>T7</b>	Lomo de cerdo con sobrenadante <i>L. plantarum</i>	20°C
<b>T8</b>	Lomo de cerdo con sobrenadante <i>L. plantarum</i>	4°C

### 4.3 Diseño Experimental

Para algunas pruebas se emplearon análisis descriptivos (pruebas de inhibición *in vitro* y antibiograma), sin embargo, para evaluar la efectividad de los bioconservantes se utilizó un diseño de bloques al azar con arreglo factorial 4x2 con dos réplicas por tratamiento, distribuidos de la siguiente manera: 4 tratamientos (testigo, *L. lactis*, *L. plantarum* y A. láctico), 2 temperaturas (ambiente: 20 °C y refrigeración: 4 °C) y como bloque 3 tiempos (0, 7 y 15 días).

El modelo matemático es el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + \beta_j + y_k + (Ty)_{ik} + \epsilon_{ijkl}$$

Dónde:

$Y_{ijkl}$ : Observaciones

$\mu$  : Media general

$T_i, y_k$ : Efectos producidos por los dos factores evaluados (bioconservante y temperatura).

$\beta_j$ : Efecto del Bloque (tiempo).

$(Ty)_{ik}$  : Interacción producto de la combinación de los factores.

$\epsilon_{ijkl}$  : Término de error.

Para observar las diferencias entre los tratamientos se aplicó comparaciones múltiples de medias con la prueba de significancia de Tukey, mediante el paquete estadístico S.A.S versión 9.1 versión 2004.

#### 4.3.1 Análisis de varianza con prueba de Fisher LSD para análisis sensorial

Mediante la utilización del paquete estadístico S.A.S., se determinó diferencias en las variables sensoriales.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Prueba de antibióticos

A continuación se muestran los datos reportados para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana mediante el método de Kirby Bauer (Cuadro 1).

#### *Cuadro 1.*

#### *Poder antagonico de antibióticos comerciales frente a cepas de estudio.*

Cepas de estudio ATCC	Diámetros del halo de inhibición (mm)											
	Antibióticos											
	DCX 1		FEP 30		KF 30		CIP 5		CN 10		P 10	
<i>L. lactis</i>	8	<b>R</b>	10	<b>R</b>	8	<b>R</b>	46	S	26	S	35	S
<i>L. plantarum</i>	10	S	7	<b>R</b>	8	<b>R</b>	40	S	28	<b>R</b>	8	S
<i>C. perfringens</i>	6	<b>R</b>	10	<b>R</b>	30	S	NA	-	NA	-	8	<b>R</b>
<i>S. typhimurium</i>	NA	-	32	S	12	<b>R</b>	45	S	23	<b>R</b>	NA	-
<i>E. coli</i>	NA	-	30	S	10	<b>R</b>	42	S	22	<b>R</b>	NA	-
<i>S. aureus</i>	6	<b>R</b>	20	S	45	S	NA	-	NA	-	20	<b>R</b>

DCX: Dicloxacilina; FEP: Cefepime; KF: Cefalotina; CIP:Ciprofloxacina; CN:Gentamicina; P 10:

Penicilina; NA: No aplica; S: sensible; R: resistente

Las bacterias evaluadas presentaron susceptibilidad a los siguientes antibióticos: Dicloxacilina, Ciprofloxacina y Penicilina, para *L. plantarum*; Ciprofloxacina Gentamicina y Penicilina, para *L. lactis*; Cefalotina para *C. perfringens*; Cefepime y Ciprofloxacina para *S. typhimurium*; Cefepime y Ciprofloxacina para *E. coli*; y Cefepime y Cefalotina para *S. aureus*. En la actualidad algunos microorganismos presentan resistencia a los antibióticos como consecuencia del uso indiscriminado. Este antagonismo es un mecanismo natural de supervivencia, que se produce por mutaciones y la adquisición de plásmidos (replicación del



ADN extracromosómico) (Ahmand-Bhat *et al.* 2015; Martín-Pozo *et al.* 2014). Para la presente investigación, los casos más evidentes se pueden observar en *C. perfringens* y *E. coli*. De igual manera, se observa que la cepa *Lactobacillus lactis* muestra resistencia a algunos de los antibióticos, sin embargo, es necesario realizar otros estudios para determinar si este comportamiento tiene un efecto sobre la transmisión de la resistencia a otros microorganismos.

## 5.2 Inhibición in vitro de las cepas lácticas

Las pruebas *in vitro* con *L. plantarum* y *L. lactis*, mostraron diferente susceptibilidad a las cepas; en la tabla 3 se observa que *L. plantarum* afecta el crecimiento de todas las bacterias patógenas, sin embargo, hay menor susceptibilidad para *S. tiphymurium*. Cabe resaltar que la cepa láctica tiene mayor inhibición a mayores concentraciones, con la excepción de *C. perfringens*. Por otra parte, *L. lactis* mostró menor inhibición en las cepas patógenas, ya que *S. aureus* y *S. tiphymurium* no fueron inhibidas.

**Tabla 3.**

***Prueba in vitro de Lactobacillus plantarum y Lactobacillus lactis.***

Cepas	<i>L. plantarum</i>			<i>L. lactis</i>		
	25 µl	50 µl	100 µl	25 µl	50 µl	100 µl
<i>S. aureus</i>	3.00	3.00	5.000	0.833	0.667	1.167
<i>C. perfringens</i>	1.33	3.17	2.000	3.333	4.667	5.00
<i>S. tiphymurium</i>	1.33	1.67	3.330	1.667	1.500	2.00
<i>E. coli</i>	1.50	2.33	2.500	3.000	2.667	4.50

Al respecto Pérez-Guerra (2014) y Vegas *et al.* (2013). mencionan que las BAL compiten por espacio gastrointestinal con otros microorganismos, evitando su crecimiento este fenómeno se produce por la generación de compuestos antimicrobianos (bacteriocinas) y la reducción de pH del medio. Los resultados encontrados indican que una baja concentración de las BAL resulta poco efectiva en el control de las bacterias patógenas, mejorando su efecto con el incremento de la concentración.

### 5.3 Inhibición in vitro del sobrenadante de las bal bajo 2 metodologías

Los resultados del sobrenadante para *L. plantarum* se muestran en el cuadro 2. Se observa que las cepas presentan menor susceptibilidad en el método de sensidisco que en el método de cilindros, a pesar de ello el sobrenadante no inhibió a *C. perfringens* en ninguno de los métodos.

#### *Cuadro 2.*

#### *Halos de inhibición del sobrenadante de L. plantarum en las bacterias patógenas.*

	<b>Cilindros</b>					
	<b>Filtrado</b>			<b>Sin filtrar</b>		
	<b>Concentración</b>					
<b>CEPAS</b>	<b>50 µl</b>	<b>75 µl</b>	<b>100 µl</b>	<b>50 µl</b>	<b>75 µl</b>	<b>100 µl</b>
<i>S. aureus</i>	2.5	2.5	4.5	2.0	0.0	1.0
<i>C. perfringens</i>	0.0	0.5	1.0	0.0	0.0	0.0
<i>S. tiphymurium</i>	3.5	5.0	4.3	1.5	0.5	3.5
<i>E. coli</i>	2.0	2.0	2.3	1.5	1.8	1.8
	<b>Sensidiscos</b>					
<b>CEPAS</b>	<b>50 µl</b>	<b>75 µl</b>	<b>100 µl</b>	<b>50 µl</b>	<b>75 µl</b>	<b>100 µl</b>
<i>S. aureus</i>	1.0	2.0	1.7	1.8	3.0	0.0
<i>C. perfringens</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>S. tiphymurium</i>	0.7	0.0	1.0	0.0	0.7	0.3
<i>E. coli</i>	1.0	0.7	1.3	0.5	1.3	0.7

Al respecto Jurado-Gómez *et al.* (2014) y Fontana *et al.* (2015), indican que la inhibición se debe a la producción de compuestos antimicrobianos (bacteriocinas) y los productos de la

fermentación (ácido láctico, acético y propiónico) presentes en el sobrenadante. De esta manera se observó mejor inhibición de la bacteria láctica en comparación con su sobrenadante.

Para el caso de *L. lactis*, la prueba indicó menor inhibición que *L. plantarum* (cuadro 3). En este caso, al igual que la otra bacteria láctica, el sensidisco presentó mayores susceptibilidades.

**Cuadro 3.**

***Halos de inhibición del sobrenadante de L. lactis sobre las bacterias patógenas.***

	Cilindros					
	Filtrado			Sin filtrar		
	Concentración					
CEPAS	50 µl	75 µl	100 µl	50 µl	75 µl	100 µl
<i>S. aureus</i>	2.83	4.17	3.17	1.67	2.17	2.33
<i>C. perfringens</i>	0.50	1.17	1.17	0.17	0.00	0.50
<i>S. tiphymurium</i>	0.67	0.50	2.83	2.33	0.00	0.00
<i>E. coli</i>	1.33	0.33	1.17	0.83	0.33	0.83
	Sensidiscos					
	Concentración					
	CEPAS	50 µl	75 µl	100 µl	50 µl	75 µl
<i>S. aureus</i>	2.00	2.33	3.17	1.83	2.17	1.83
<i>C. perfringens</i>	2.00	1.75	1.75	0.75	1.75	1.00
<i>S. tiphymurium</i>	2.25	1.50	2.00	2.25	2.75	1.00
<i>E. coli</i>	1.75	1.25	1.50	3.50	2.75	3.50

Los resultados muestran que la cepa láctica inhibe a todas las cepas (método de sensidisco). sin embargo, hay mayor susceptibilidad para *S. aureus* y *E. coli*. Sankar *et al.* (2012), encontraron susceptibilidad de *E. coli* y *S. aureus* por bacteriocinas producidas por *L. plantarum* mientras que Rajaram *et al.* (2010) encontraron que *L. lactis* inhibió a *E. coli* y *S. aureus*. A pesar de que las cepas *S. aureus* y *S. tiphymurium* fueron resistentes a la cepa láctica, el sobrenadante inhibió a *S. aureus* mostrando un efecto de la cepa en la bacteria patógena.

#### 5.4 Pruebas de catalasa y gas

Las pruebas de gas y catalasa para *L. plantarum* y *L. lactis* fueron negativas. Estas características son importantes en la evaluación de microorganismos probióticos, dado que la primera indica que la cepa no produce gas, que altere las funciones del tracto gastrointestinal del huésped, mientras que la segunda indica que la cepa pertenece al género de los *Lactobacillus* (Jurado-Gómez *et al.* 2013<sup>a</sup>); Akabanda *et al.* 2013).

#### 5.5 Pruebas de viabilidad a diferentes pH y temperatura

La prueba de viabilidad a diferentes pH indicó que, *L. plantarum* es resistente a modificaciones de la acidez del medio (tabla 4). Iguales resultados se observaron en *L. lactis* (tabla 4). Los valores de crecimiento son adecuados para garantizar la viabilidad probiótica de las cepas (Jurado-Gómez *et al.* 2013b). Los valores de crecimiento a diferentes temperaturas evidencian la viabilidad a diferentes temperaturas y la viabilidad durante el procesamiento de fabricación de alimentos balanceados (45°C) (Ganzle 2015).

Las BAL mostraron tolerancia a pH bajo debido a su capacidad de fermentar diferentes carbohidratos (pentosas y hexosas) y obtener como producto final ácido láctico, que disminuye el pH del medio (Karlskas *et al.* 2013; Ganzle 2015). Esta característica es fundamental para la producción de inóculos durante los procesos de fermentación a escala industrial (Visikili *et al.* 2014).

**Tabla 4.****Crecimiento de BAL a diferentes pH.**

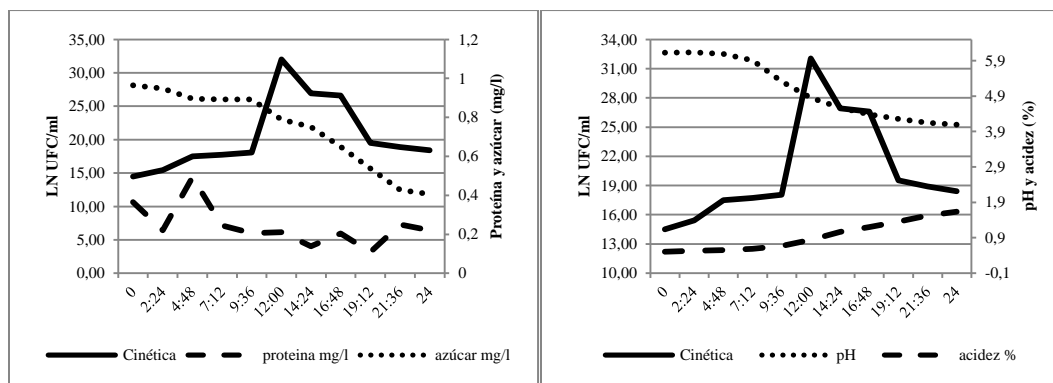
Cepa	Tiempo	2	4.5	7
<i>L. plantarum</i>	1ra	$3.0 \times 10^{12}$	$3.4 \times 10^{10}$	$2.3 \times 10^9$
	2 da	$1.3 \times 10^{11}$	$2.8 \times 10^{11}$	$3.1 \times 10^{10}$
	3ra	$1.58 \times 10^{12}$	$2.5 \times 10^{12}$	$3.14 \times 10^{12}$
<i>L. lactis</i>	1ra	$9.0 \times 10^{11}$	$6.0 \times 10^{10}$	$5.0 \times 10^{10}$
	2 da	$1.8 \times 10^{11}$	0	$35 \times 10^{11}$
	3ra	$1.1 \times 10^{11}$	$2.0 \times 10^{10}$	$1.0 \times 10^{10}$

**Tabla 5.****Crecimiento de las BAL a diferentes temperaturas.**

Temperatura	<i>L. lactis</i>	<i>L. plantarum</i>
38°C	$1.2 \times 10^{13}$	$5.2 \times 10^{13}$
45°C	$2.0 \times 10^{13}$	$3.0 \times 10^{13}$

## 5.6 Cinética de fermentación

La fase exponencial de la cinética de crecimiento para *L. plantarum* se presentó a las 12 h de iniciada la fermentación con un pH de 4.8 y una acidez de 0.84%; durante este tiempo el pH descendió en 1.276 y la acidez aumentó en 0.331%. De igual manera, se observó valores de 0.789 mg/l de azúcar y 0.211 mg/l de proteína durante la fase exponencial, con un consumo de 0.176 mg/l de azúcar y 0.155 mg/l de proteína durante las primeras 12 horas de fermentación (figura 1).



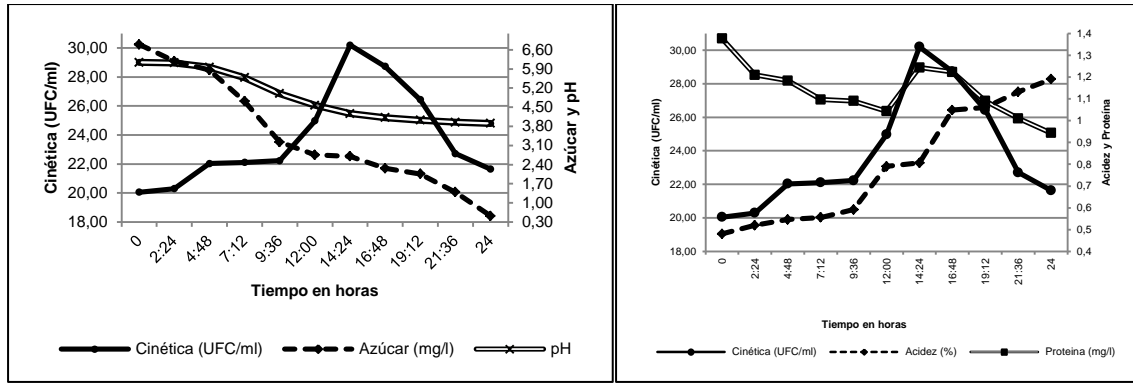
**Figura 1. Cinética de crecimiento de *L. plantarum* proteína, azúcar, pH y acidez en el medio MRS.**

Fuente este estudio

La cantidad de bacterias viables encontradas durante la fase exponencial permite la producción de inóculos ( $8.2 \times 10^{13}$  UFC/ml; 32.03 LN UFC/ml) (Calpa-Yama y Chaspuengal-Tulcan 2013). El crecimiento bacteriano nuevamente demostró la resistencia de *L. plantarum* a bajas concentraciones de pH y el aumento de la acidez evidencia el proceso fermentativo de los carbohidratos presentes en el medio de cultivo. Todas estas características confirman que *L. plantarum* puede manejarse a nivel industrial.

La disminución del azúcar durante la cinética se debe a su empleo en los procesos metabólicos de la bacteria láctica; de esta manera, se garantiza que la cepa obtenga energía para su normal desarrollo y genere ácidos orgánicos que permite un descenso de pH y la inhibición de otros microorganismos presentes en el medio (Faouzi *et al.* 2014).

En cuanto a *L. lactis* los resultados, para la cinética de fermentación, mostraron que la fase exponencial se obtuvo a las 14 h 24 min con un crecimiento de 30.20 LN UFC/mL en el medio MRS; durante este periodo, se observó un valor de 4.26 en el pH; 0.806% en la acidez. 1.24 mg/L de proteína y 2.70 mg/L de azúcar (figura 2).



**Figura 2. Cinética de fermentación. pH. azúcar. acidez y proteína de *L. lactis* en medio MRS.**

Fuente este estudio

El análisis mostró un incremento de 0.0339 para acidez; un descenso de 0.1936, 0.3834 mg/l y 0.0050 mg/l para pH, proteína y azúcar respectivamente, durante las 14 h 24 min (fase exponencial).

El consumo de proteína para ambas cepas lácticas muestra un descenso durante las primeras horas de fermentación, debido a su utilización en la formación de nuevas células (Jurado-Gómez *et al.* 2013a. Saez-Lara *et al.* 2015), sin embargo, en *L. lactis* se observa un incremento durante la fase exponencial, lo cual indica la formación de sustancias proteicas en el medio, como biocinas y aminoácidos libres, siendo importantes las primeras en la inhibición de microorganismos (Faouzi *et al.* 2014).

En la tabla 8 se observa el resumen de la cinética de fermentación, Se observa una mayor velocidad de crecimiento en *L. plantarum*, lo que se refleja en un menor tiempo para la fase exponencial y un mayor incremento de células totales.

**Tabla 6.****Resumen cinética de fermentación.**

	<i>L. plantarum</i>	<i>L. lactis</i>
<b>Fase lat. (h)</b>	0	0
<b>Velocidad específica de crecimiento (<math>\mu</math> h<sup>-1</sup>)</b>	2,971	2,597
<b>Fin fase log (h)</b>	12:00	14:24
<b>Tiempo de duplicación (min)</b>	14	16
<b>Incremento cel. Total (UFC/ml)</b>	$1,35 \cdot 10^{11}$	$5,74 \cdot 10^7$
<b>Incremento cel. Fin fase log (UFC/ml)</b>	$6,75 \cdot 10^{12}$	$1,20 \cdot 10^{12}$
<b>% azúcares consumidos totales (mg/l)</b>	33,04	51,06
<b>% azúcares consumidos fin fase log (mg/l)</b>	24,65	38,74
<b>R<sup>2</sup></b>	0,914	0,963



### 5.7 Péptidos en el sobrenadante.

Los resultados se pueden observar en la tabla y el patrón en la tabla 7.

**Tabla 7.**

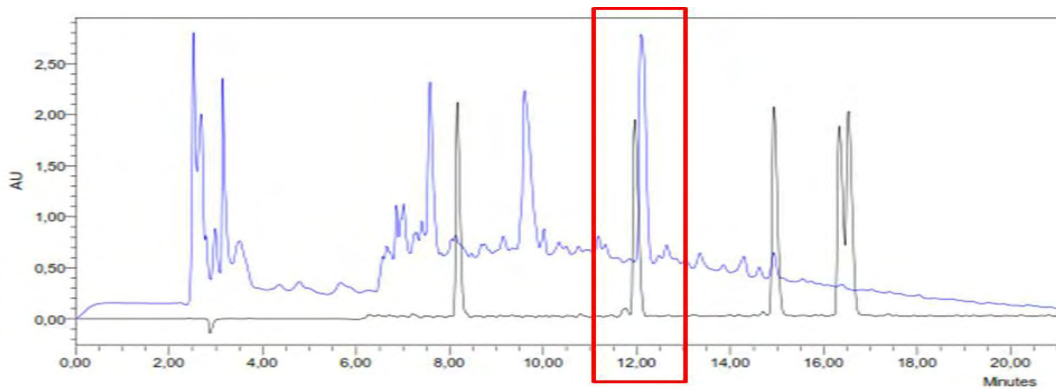
**Resultados péptidos en sobrenadante.**

Pico n°	<i>L. plantarum</i>		<i>L. lactis</i>	
	Tiempo de retención	Cantidad relativa en % promedio	Tiempo de retención	Cantidad relativa en % promedio
1	2.511	9.52	2.526	6.74
2	2.695	5.30	2.695	5.69
3	2.984	2.63	3.039	3.43
4	3.145	9.50	3.567	2.99
5	3.506	2.57	5.514	2.31
6	7.403	0.67	6.585	12.38
7	7.572	13.66	9.021	22.48
8	9.595	16.99	<b>11.842</b>	<b>30.92</b>
9	<b>12.100</b>	<b>27.91</b>	12.343	0.99
10	13.856	0.59	14.026	2.52
11	14.618	0.81	14.737	1.46
12	14.932	1.83	15.398	0.33

**Tabla 8.****Mezcla de péptidos patrón.**

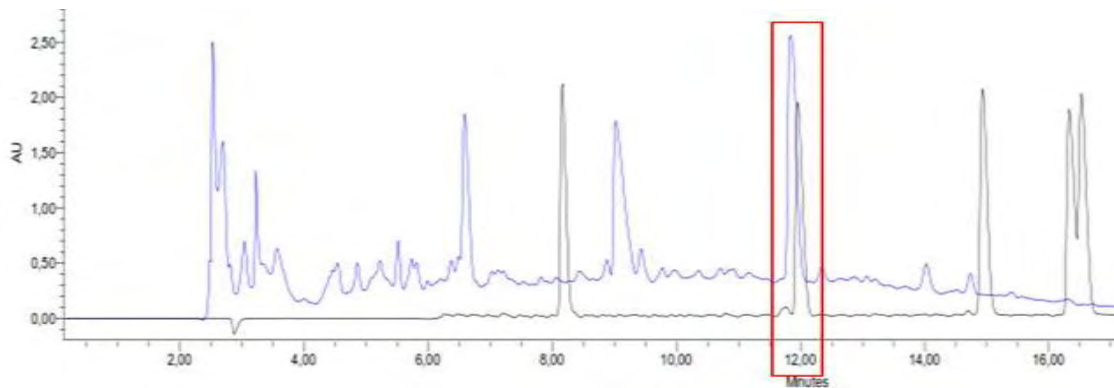
No. Pico	Nombre	Tiempo de retención	Área	Cantidad relativa %
1	GLY-TYR	8.16	13536607	17.32
2	VAL-TYR-VAL	11.954	15409159	19.71
3	Metionine Enkefalin Acetate	14.933	16289583	20.84
4	Leucine Enkefalin	16.328	15163721	19.4
5	Angiotensin II Acetate	16.525	17776696	22.74

*Lactobacillus plantarum* mostró el péptido VAL-TIR-VAL en el sobrenadante, en el pico número 9, con una concentración de 0.68 mg/mL (figura 3). *Lactobacillus lactis* mostró la misma cadena peptídica en el sobrenadante, con una concentración de 0.66 mg/ml de muestra (figura 4). El patrón indica que esta cadena pertenece a péptidos con anillos aromáticos presentes en sustancias opioides y antihipertensivos. Se esperaba encontrar cadenas que demuestren la presencia de bacteriocinas en el sobrenadante, sin embargo, esto no sucedió, pero no significa que estas sustancias no se hayan producido, ya que los resultados obtenidos en la investigación muestran que las bacterias lácticas redujeron el crecimiento microbiano.



**Figura 3. Resultados de la cromatografía de los péptidos presentes en *L. plantarum*.**

Fuente este estudio



**Figura 4. Resultados de la cromatografía de los péptidos presentes en *L. lactis*.**

Fuente este estudio

## 5.8 Bioconservación

En la tabla 9 y 10, se observa los resultados obtenidos para las variables coliformes totales, coliformes fecales, *Listeria* sp., mohos y levaduras (15 días), pH, acidez y capacidad de retención de agua. Se debe aclarar que no existió interacción entre los factores para ninguna de las variables ( $p > 0.05$ ). De esta manera, únicamente se evaluaron los efectos principales: aditivo y temperatura. En la tabla 6 se observan los valores obtenidos para *Clostridium* sulfito reductor,

hongos y levaduras.

**Tabla 6.**

*Valores promedio para el factor aditivo.*

<b>Método</b>	<b>C. ttal</b> (UFC /g)	<b>C. fec</b> (UFC/g)	<b>M_L (15)</b> (UFC)	<b>pH</b>	<b>Acidez</b> (%)	<b>CRA</b>
sin aditivo	844.7 <sup>a</sup>	224.5 <sup>a</sup>	48.00 <sup>a</sup>	5.68 <sup>a</sup>	0.080 <sup>b</sup>	3.42 <sup>b</sup>
ácido Láctico	765.8 <sup>a</sup>	100.0 <sup>b</sup>	48.75 <sup>a</sup>	5.67 <sup>a</sup>	0.088 <sup>b</sup>	3.76 <sup>a</sup>
<i>L. lactis</i>	685.5 <sup>a</sup>	50.8 <sup>b</sup>	48.50 <sup>a</sup>	5.65 <sup>a</sup>	0.088 <sup>ab</sup>	3.46 <sup>b</sup>
<i>L. plantarum</i>	557.2 <sup>a</sup>	42.3 <sup>b</sup>	32.20 <sup>b</sup>	5.66 <sup>a</sup>	0.097 <sup>a</sup>	3.97 <sup>a</sup>

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). C. ttal: coliformes totales. C.fec: coliformes fecales. M\_L (15): mohos y levaduras a los 15 días. CRA: capacidad de retención de agua.

**Tabla 7.**

*Valores promedio el factor temperatura.*

<b>Temperatura</b>	<b>C. ttal</b> (UFC/g)	<b>C. fec</b> (UFC/g)	<b>M_L (15)</b> (UFC)	<b>pH</b>	<b>Acidez</b> (%)	<b>CRA</b>
Refrigeración	324.4 <sup>b</sup>	67.0 <sup>b</sup>	10.63 <sup>b</sup>	5.71 <sup>a</sup>	0.093 <sup>a</sup>	3.64 <sup>a</sup>
Ambiente (20°C)	1102.2 <sup>a</sup>	141.7 <sup>a</sup>	78.25 <sup>a</sup>	5.62 <sup>b</sup>	0.084 <sup>b</sup>	3.67 <sup>a</sup>

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), C. ttal: coliformes totales, C.fec: coliformes fecales, M\_L (15): mohos y levaduras a los 15 días, CRA: capacidad de retención de agua.

**Tabla 8.**

*Valores encontrados para la prueba de Clostridium sulfito reductor. Mohos y levaduras. Listeria sp. y antibióticos.*

MÉTODO	TEMP	Clostridium (UFC)			M_L (UFC)			List.	Antib.
		día 0	día 7	día 15	día 0	día 7	día 15	día 0	día 0
SA	AMB	-	-	-	0	0	86 <sup>a</sup>	Neg	Neg
SA	REF	-	-	-	0	0	10 <sup>c</sup>	Neg	Neg
AL	AMB	-	-	-	0	0	88 <sup>a</sup>	Neg	Neg
AL	REF	-	-	-	0	0	10 <sup>c</sup>	Neg	Neg
LACTIS	AMB	-	-	-	0	0	85 <sup>a</sup>	Neg	Neg
LACTIS	REF	-	-	-	0	0	13 <sup>c</sup>	Neg	Neg
PLANT	AMB	-	-	-	0	0	55 <sup>b</sup>	Neg	Neg
PLANT	REF	-	-	-	0	0	10 <sup>c</sup>	Neg	Neg

SA: sin aditivo; AL: con ácido láctico; LACTIS: con *L. lactis*; PLANT: con *L. plantarum*; M-L: Mohos y levaduras; List: prueba de listeria; Antib: prueba de antibióticos. Neg: resultado negativo. Signo – en *Clostridium* significa ausencia del agente. Letras diferentes en la misma columna muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Los resultados para coliformes totales en el factor aditivo (sin aditivo. ácido láctico. *L. lactis* y *L. plantarum*), no mostraron diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ . tabla 9), pero se observó diferencias en el factor temperatura (ambiente 20°C y refrigeración 4°C), con un mayor crecimiento en la porción de lomos sin refrigerar ( $p < 0.05$ . tabla 9).

El conteo de coliformes totales permite evaluar la calidad higiénica de la carne. Los resultados mostraron que el factor aditivo está dentro de los parámetros de calidad sanitaria reportada por el INVIMA para carnes crudas (120-1100 UFC/g). A pesar de no encontrarse diferencias significativas, se observa que las cepas lácticas disminuyen el número de bacterias por gramo. Al respecto, Ghanbari et al. (2013) mencionan que las bacterias ácido lácticas reducen el crecimiento de coliformes y su acción se debe a la producción de varios compuestos antimicrobianos, entre los que se encuentran las bacteriocinas, los ácidos orgánicos y el peróxido de hidrógeno; este tipo de compuestos afectan diferentes zonas de la bacteria, como la pared celular (algunas bacteriocinas) y alteran sus procesos fisiológicos (ácidos orgánicos).

En el caso de coliformes fecales, se observó diferencias en ambos factores (aditivo y temperatura) ( $p < 0.05$ , tabla 9 y 10); para la comparación del factor aditivo, la estadística reveló un mayor crecimiento de coliformes fecales en los lomos sin aditivo en comparación con los otros métodos (ácido láctico, *lactis* y *plantarum*), mientras que, para la comparación de temperatura, se encontró mayor crecimiento en los lomos sin refrigerar.

Las sustancias agregadas (a. láctico, *L. lactis* y *L. plantarum*) mostraron efectividad en la reducción del crecimiento de coliformes fecales. Sin embargo, las BAL tuvieron un efecto mayor, con valores de crecimiento 50% menores al observado con el ácido láctico. Las coliformes fecales son un buen indicador del manejo de los cárnicos, ya que se encuentran muy relacionadas con la calidad sanitaria del producto y el manejo de la carne (Franco *et al.* 2013), reducir su crecimiento es importante debido a los problemas de toxii infecciones que generan en animales y humanos.

En investigaciones realizadas por Jurado-Gómez *et al.* (2015a, 2015b) y los resultados de esta investigación, se encontró que las cepas lácticas poseen un efecto de inhibición sobre *E. coli* en condiciones *in vitro*, se sabe que esta cepa patógena es una de las principales representantes de

las coliformes fecales, ya que es un huésped natural del tracto gastrointestinal y que su diseminación se observa como resultado de un inadecuado manejo de la carne. Los efectos del ácido láctico son buenos, pero las bacterias lácticas ofrecen otro tipo de beneficio para el producto, como mejorar su terneza y olor, valores agregados que ponen a las BAL como alternativas importantes en la conservación de productos cárnicos.

Para el caso de *Clostridium* sulfito reductor, todos los resultados de la prueba mostraron ausencia del agente, esto demuestra que no existió contaminación por este patógeno en la carne. La importancia de este microorganismo radica en los problemas de intoxicación por la toxina botulínica, la cual afecta el sistema nervioso, produciendo náuseas, vómito y, en los casos más severos, parálisis muscular. Los reportes de la literatura demuestran que bacteriocinas como la nisina tienen efecto antagónico sobre el microorganismo (Wijnker *et al.* 2011).

Se observó crecimiento de mohos y levaduras únicamente en el día quince con un rango de 10 a 88 UFC (tabla 11); en este día, se encontró un menor crecimiento con el sobrenadante de *L. plantarum* (500uL) ( $p < 0.05$ , tabla 11). De igual manera, la temperatura disminuyó el crecimiento, debido a que se encontró valores inferiores en los lomos refrigerados ( $p > 0.05$ ).

El pH no mostró diferencias significativas en el factor *aditivo* ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, la temperatura mostró diferencias estadísticas con mayores valores de pH para los lomos refrigerados ( $p < 0.05$ , tabla 4 y 5). Por otra parte, la acidez titulable expresada en porcentaje indicó diferencias en el factor *aditivo* ( $p < 0.05$ ), con valores más altos para *L. plantarum* (0.097%) en comparación con el ácido láctico (0.088%) y el testigo (0.088%). En cuanto a la temperatura de conservación, se encontró menores valores en las muestras de lomo sin refrigerar ( $p < 0.05$ ; 0.084%; tabla 10).

El pH es importante en el crecimiento de bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Clostridium ssp.*, *Listeria sp.* Estos patógenos crecen adecuadamente a pH cercanos a la

neutralidad (7.0-7.2), sin embargo, especies como *E. coli* pueden crecer en pH cercanos a 4 (Montville, 2009). Los valores obtenidos están por debajo del pH adecuado para las bacterias; por lo cual, se disminuye la probabilidad de contaminación de los productos cárnicos. Por otra parte, la refrigeración tuvo un efecto significativo sobre la variable pH. La baja temperatura afectó los procesos metabólicos de las bacterias y disminuyó la producción de ácido láctico, por consiguiente evitó un descenso en el pH.

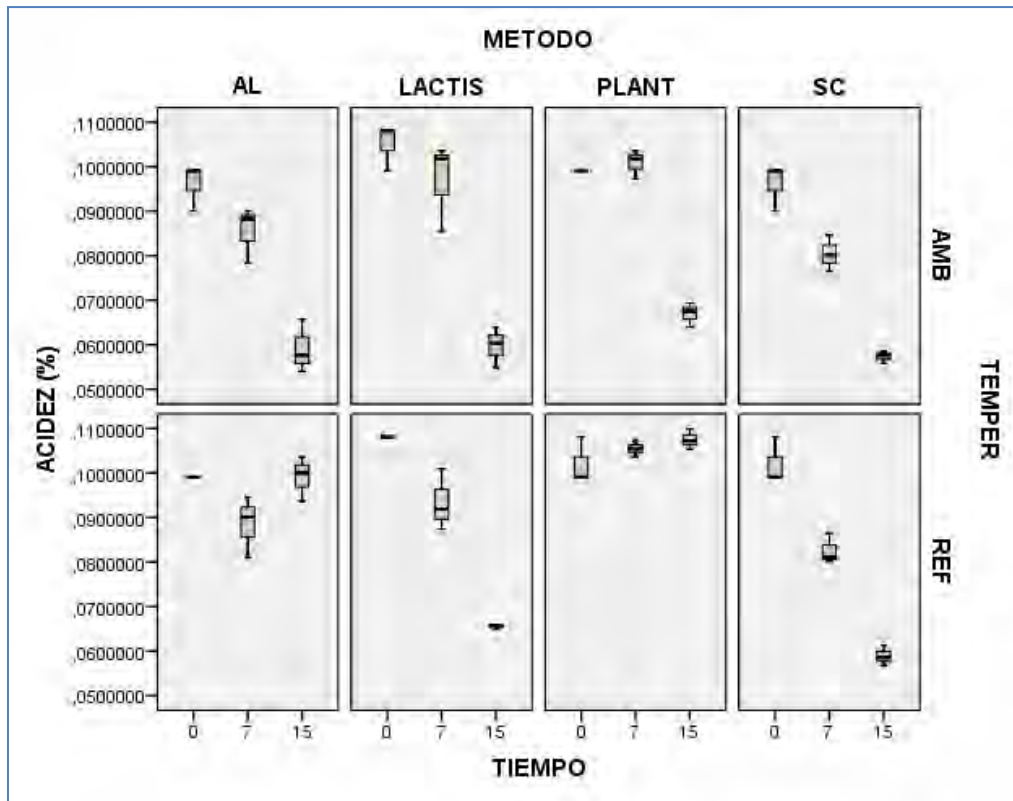
En cuanto a la acidez, se encontró que *L. plantarum* incrementa los niveles de acidez presentes en la carne y a su vez permite una disminución del pH. Este comportamiento se debe a la producción de ácido láctico por parte de la BAL, como consecuencia del metabolismo de los carbohidratos presentes en el medio. Esto es importante porque, como se mencionó anteriormente, estas condiciones afectan el crecimiento de microorganismos perjudiciales para la salud del consumidor.

Los valores de capacidad de retención de agua indicaron que *L. plantarum* (3.97) y ácido láctico (3.76), tuvieron mayor capacidad de retención de agua que *L. lactis* (3.42) y el testigo (3.46) ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, la temperatura no tuvo un efecto significativo sobre la variable ( $p > 0.05$ ).

La capacidad de retención de agua (CRA), fue más baja en los lomos sin conservante y los lomos con adición de *L. lactis*, sin embargo, la mayor CRA se encontró en *L. plantarum*. Esta característica, es altamente deseable en los productos cárnicos como el lomo de cerdo, por cuanto permite una mayor palatabilidad y ternura, que aumentan las características organolépticas del producto. Además, de aumentar el rendimiento comercial de la carne.

En las figuras 3. 4 y 5, se observa el comportamiento de las variables acidez, capacidad de retención de agua y pH en los días 0, 7 y 15, teniendo en cuenta los factores aditivo y temperatura.





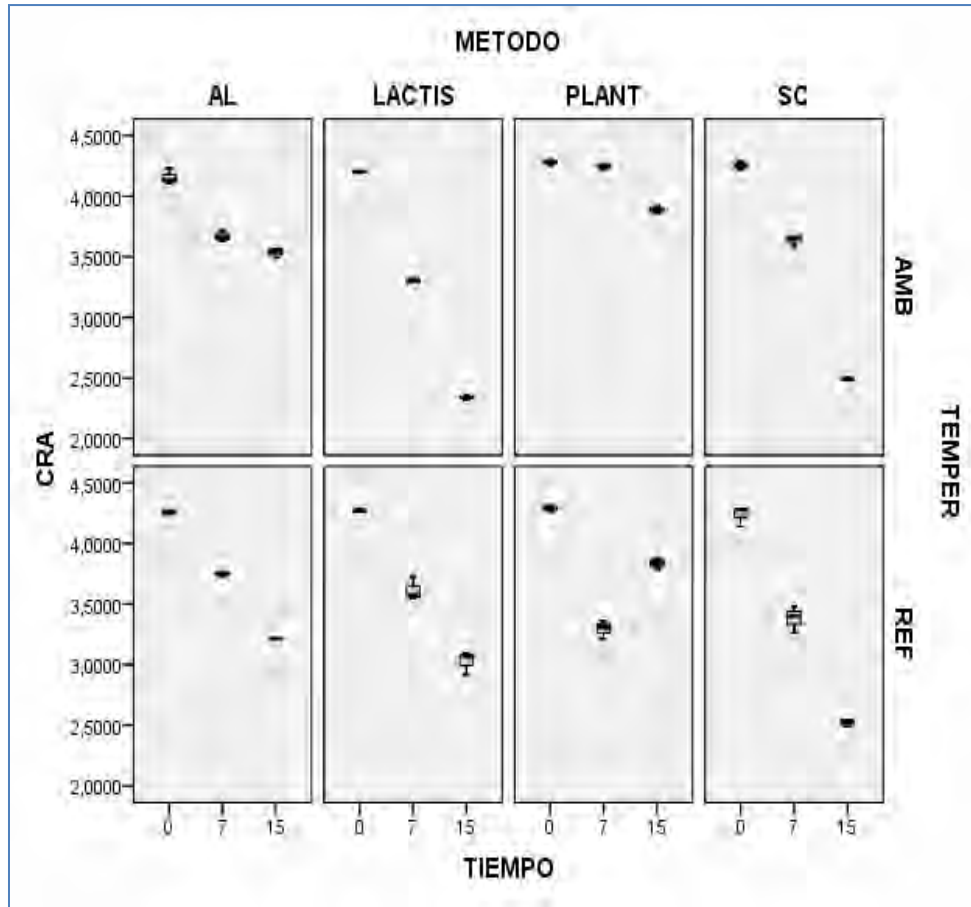
**Figura 3. Variable acidez de la carne.**

Fuente este estudio

AL: ácido láctico; LACTIS: *Lactobacillus lactis*; PLANT: *Lactobacillus plantarum*; SC: sin aditivo; AMB; temperatura ambiente (20°C); REF: temperatura refrigeración (4°C); tiempo: días 0, 7 y 15.

Se determinó una reducción de la acidez en el tiempo, para *L. lactis* y sin aditivo del factor aditivo, con una disminución de 0.045 y 0.040 puntos porcentuales para la primera y segunda, respectivamente. Sin embargo, para el caso de *L. plantarum* bajo refrigeración, se observa un leve incremento de 0.005 puntos porcentuales entre los días 0 y 15, mientras que a temperatura ambiente se encontró un incremento hasta el día 7, seguido por un descenso de la acidez al día 15 (figura 6).

La capacidad de retención de agua mostró reducción en el tiempo para todas las muestras (figura 6).

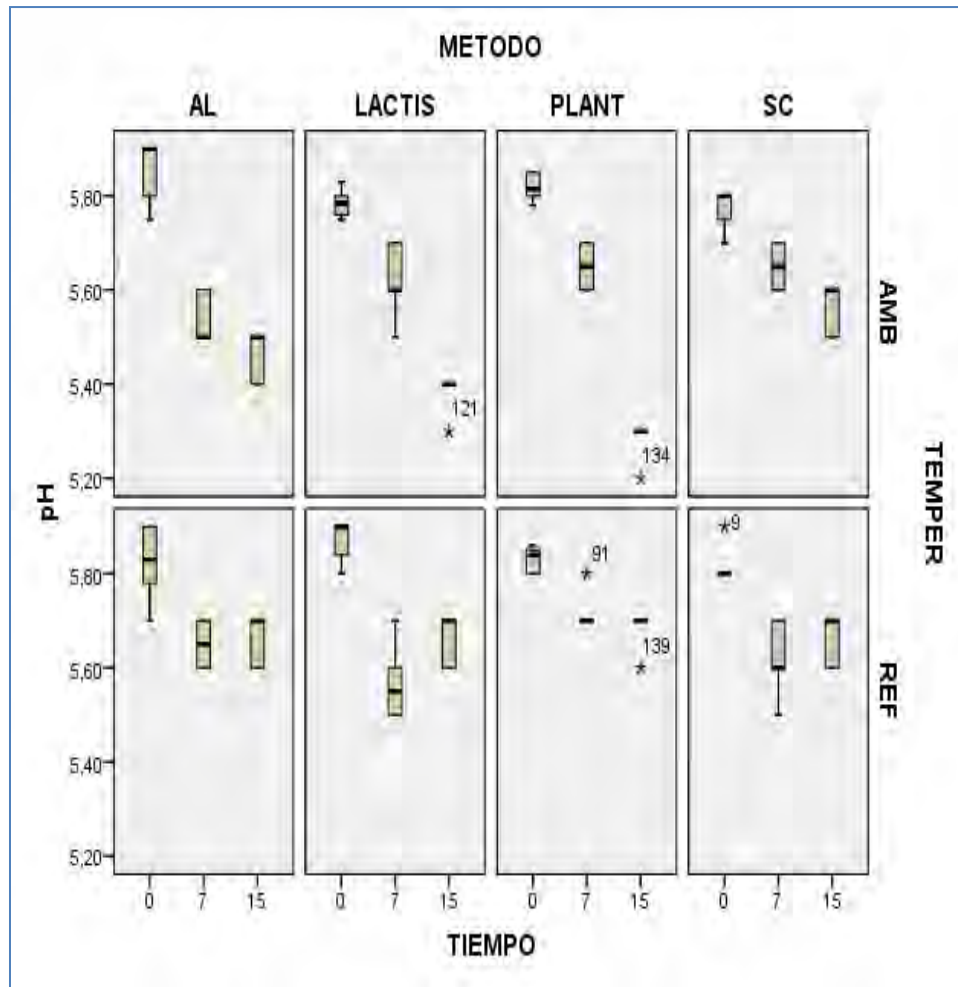


**Figura 4. Variable capacidad de retención de agua.**

Fuente este estudio

AL: ácido láctico; LACTIS: *L. lactis*; PLANT: *Lactobacillus plantarum*; SC: sin aditivo; AMB; temperatura ambiente (20°C); REF: temperatura refrigeración (4°C); tiempo a los días 0, 7 y 15.

Por otra parte, el pH disminuyó con el tiempo, con una mayor caída del pH en el tratamiento con *L. plantarum* sin refrigeración (figura 5).



**Figura 5. Variable pH.**

Fuente este estudio

AL: ácido láctico; LACTIS: *Lactobacillus lactis*; PLANT: *Lactobacillus plantarum*; SC: sin aditivos; AMB; temperatura ambiente (20°C); REF: temperatura refrigeración (4°C); tiempo a los días 0, 7 y 15.

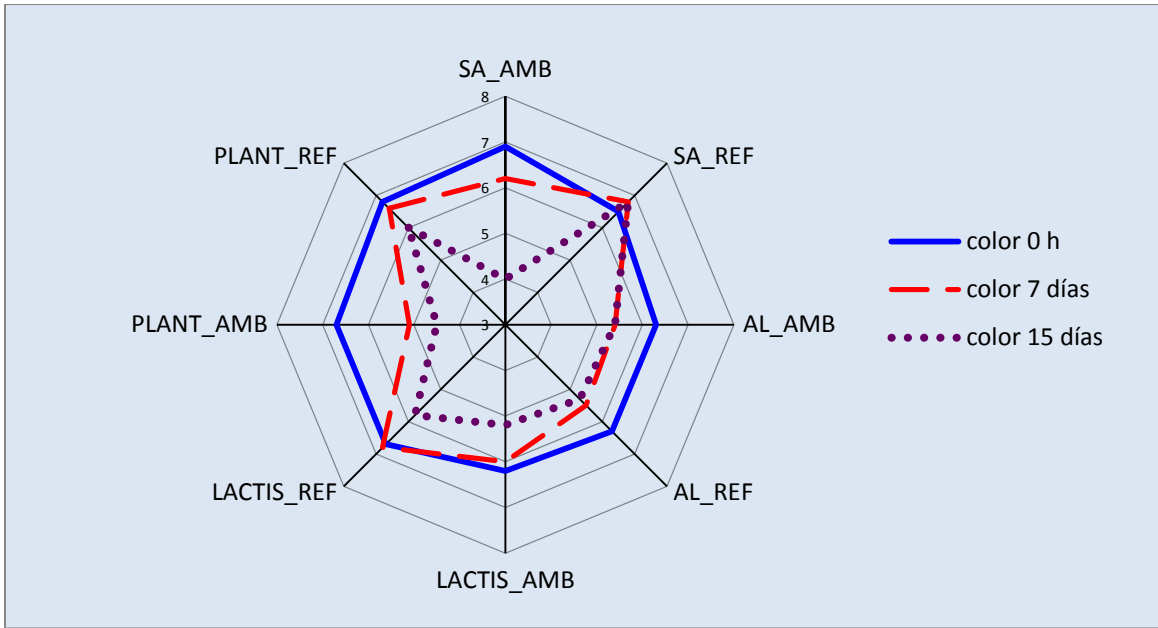
En cuanto al análisis sensorial, los resultados pueden observarse en la tabla 12 y 13, figuras 8 y 9.

**Tabla 9.****Límite de aceptabilidad de los tratamientos evaluados**

<b>Tratamiento</b>	<b>Atributo</b>	<b>p-Valor*</b>	<b>Día de Inaceptabilidad**</b>
Sin aditivo y ambiente (20°C)	Color	<0.05	15
	Olor	<0.05	15
Sin aditivo y refrigerado (4°C)	Color	>0.05	ND
	Olor	>0.05	ND
Á. láctico y ambiente (20°C)	Color	>0.05	ND
	Olor	<0.05	0
Á. láctico y refrigerado (4°C)	Color	>0.05	ND
	Olor	>0.05	0
<i>L. lactis</i> y ambiente (20°C)	Color	>0.05	ND
	Olor	<0.05	0
<i>L. lactis</i> y refrigerado (4°C)	Color	>0.05	ND
	Olor	<0.05	ND
<i>plantarum</i> y ambiente (20°C)	Color	<0.05	7
	Olor	>0.05	ND
<i>L. plantarum</i> y refrigerado (4°C)	Color	>0.05	ND
	Olor	>0.05	ND

\*p-Valor < 0.05 existe diferencia significativa entre días comprendido en el periodo de análisis.

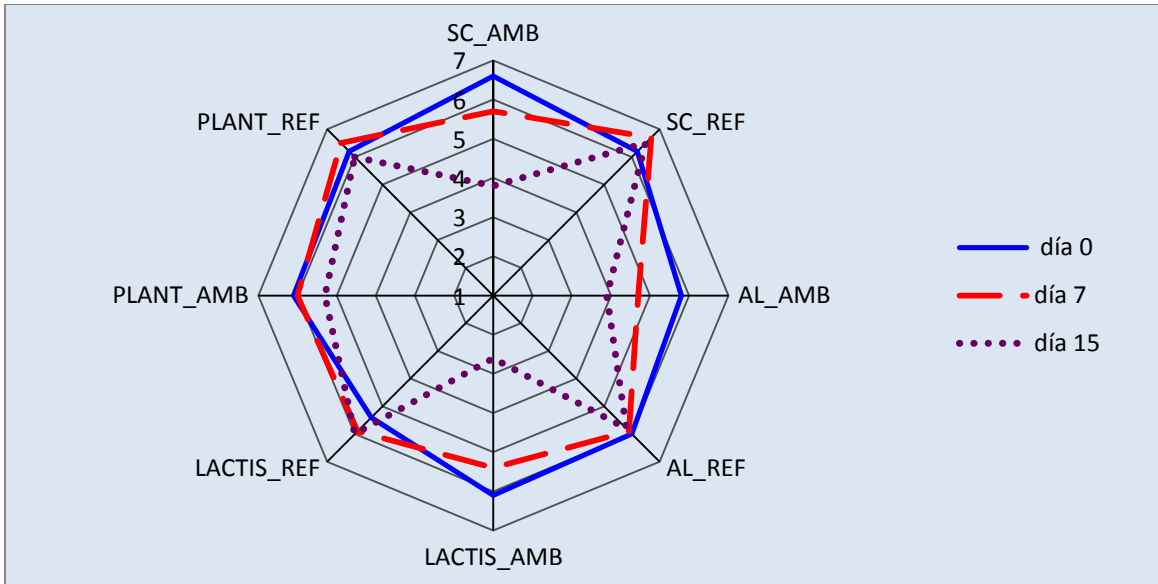
\*\*ND=No determinado.



**Figura 6. Gráfico de radar para color.**

Fuente este estudio

SC\_AMB: sin conservante y al ambiente; SC\_REF: sin conservante y refrigerado;  
 AL\_AMB: ácido láctico y al ambiente; AL\_REF: ácido láctico y refrigerado; LACTIS\_AMB:  
*Lactobacillus lactis* y al ambiente; LACTIS\_REF: *Lactobacillus lactis* y refrigerado;  
 PLANT\_AMB: *Lactobacillus plantarum* y al ambiente; PLANT\_REF: *Lactobacillus plantarum*  
 y refrigerado.



**Figura 7. Gráfico de radar variable olor.**

Fuente este estudio

SC\_AMB: sin conservante y al ambiente; SC\_REF: sin conservante y refrigerado; AL\_AMB: ácido láctico y al ambiente; AL\_REF: ácido láctico y refrigerado; LACTIS\_AMB: *Lactobacillus lactis* y al ambiente; LACTIS\_REF: *Lactobacillus lactis* y refrigerado; PLANT\_AMB: *Lactobacillus plantarum* y al ambiente; PLANT\_REF: *Lactobacillus plantarum* y refrigerado.

Los tratamientos tuvieron una mayor influencia sobre el olor, que en el color. Se observó que la adición de ácido láctico afecta estadísticamente el olor desde el primer día (día 0), igual resultado se observó con *L. lactis* sin refrigeración (tabla 6). Por otra parte, para la variable color, los lomos sin aditivo fueron inaceptables al día 15 y los lomos con *L. plantarum*, al día 7 ( $p < 0.05$ ), ambos expuestos a temperatura ambiente.

En el gráfico de radar para color (figura 6), se observa que la aceptabilidad del parámetro organoléptico disminuye con el tiempo, siendo el tratamiento sin aditivo y sin refrigeración el que mayor efecto presentó. Por otra parte, el tratamiento con *L. plantarum* y con refrigeración,

mostró un menor efecto del tiempo sobre el color.

Se observa que el tratamiento con la menor puntuación al día 15 fue la cepa de *Lactobacillus lactis* sin refrigeración, seguida por el tratamiento sin aditivo y sin refrigerar.

Como era de esperarse, la prueba sensorial mostró que la carne sin conservación y al ambiente altera el color y olor de la carne. De igual manera, el ácido láctico afectó el olor del producto, aunque mantuvo su color. En cuanto a las BAL demostraron conservar las características de color, pero *L. lactis* afectó el olor, cuando no fue refrigerada. Lo anterior demuestra, que los métodos convencionales de conservación de la carne, afectan las condiciones sensoriales de los productos cárnicos. Sparo *et al.* (2013), indican que el uso de bacterias ácido lácticas como biopreservante de productos cárnicos permite una mayor conservación, además de mejorar la calidad organoléptica del producto, lo que concuerda con los resultados obtenidos en la presente investigación. Ya que para el consumidor, la parte sensorial del producto es importante, mejorar este aspecto permite una mejor aceptabilidad del producto por parte de comprador.

## 6. CONCLUSIONES

*Lactobacillus plantarum* mostró buen potencial para inhibir el crecimiento de las bacterias patógenas evaluadas, sin embargo, su sobrenadante no inhibió a *C. perfringens*, ni *S. typhimurium*.

*L. lactis* presenta buenos parámetros de crecimiento en condiciones *in vitro*, puede inhibir el crecimiento de *E. coli*, *C. perfringens* y *S. aureus*, pero no a *S. typhimurium* en condiciones *in vitro*.

Se determinó el crecimiento exponencial a las 12 h y 14 h 24 min para *L. plantarum* y *L. lactis* respectivamente; con crecimientos adecuados de  $8.2 \times 10^{13}$  y  $1.3 \times 10^{13}$  UFC/ml. lo que indica que las cepas tienen un proceso fermentativo acorde con las necesidades de la industria de alimentos.

El sobrenadante de *L. plantarum* es una opción viable en la conservación del lomo de cerdo, conservando sus características organolépticas y minimizando la proliferación de microorganismos. Para el caso de *L. lactis*, se observa que los resultados de inhibición son similares a los lomos evaluados con ácido láctico, por lo cual, se considera como bioconservante en la carne de cerdo; aunque los resultados de esta cepa fueron inferiores a los encontrados en *L. plantarum*.



**BIBLIOGRAFÍA**

- ACP-FNP. Asociación colombiana de porcicultores y fondo nacional de la porcicultura. 2012. La carne de cerdo en el mundo. 1,4 p.
- AHMAND-BHAT, J. and AHMAND, S. Drug resistance and international issue. International Journal of Advanced Research, 2015, 3(2), p. 905-915.
- AKABANDA, F., OWUSO, J., TANO, K., GLOVE, R., NIELSEN, D. and JESPERSEN, L. Taxonomic and molecular characterization of lactic acid bacteria and yeasts in nunu, a Ghanaian fermented milk product. Food Microbiology, 2013, 34, p. 277-283.
- ARANGO, C y RESTREPO, D. 2001. Microbiología de la carne. Industria de carnes. Universidad Nacional de Colombia, Medellín. 1,3, 119 p.
- ARBOLEDA, C. 2011. Desarrollo del manual de desposte de cerdo para la empresa Carne Vally S.A. Industrial pecuario, Ciencias administrativas y agropecuarias. Caldas 31 p.
- BAUER, A. W., KIRBY, J. SHERRIS, C. y TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. Vol. 36. 1966. p. 493-496.
- CALPA-YAMA, F. y CHASPUENGAL-TULCÁN, A. Evaluación *in vitro* de *Lactobacillus casei* con características probióticas sobre *Yersinia pseudotuberculosis* [Tesis Zootecnista]. San Juan de Pasto (Colombia): Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, 2013, 98 p.
- CAI, Y, BENNO, Y, NAKASE, T. and Tae-Kwang, O. Specific probiotic characterization of Weissellahellenica DS-12 isolated from flounder intestine. Journal Genealogy Applied Microbiology. 1999, 44, p. 311-316.
- Culebras, J; García De Lorenzo, A; González, M. 2004. Nutrición Hospitalaria. Alimentos Funcionales. ND. Feb. 19(1), 1-10.
- Crueger, W. y Crueger, A. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. Traducido por

Paloma Liras Padín. 3 ed. Madrid. España: Ed. Acribia. 1993. 413 p

DUBOIS, M., GILLES, K., HAMILTON, J., REBERS, P. and SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*. 1956, 28, p. 350-356.

ESTRADA, A., GUTIERREZ, L. y MONOTYA, O. Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus* sp. contra *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*. *Revista de la Facultad Nacional Agraria Medellín*, 2003, 58(1), p. 2601-2609.

FAO. 2013. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Viejos y nuevos participantes, 16 p.

FAOUZI, L., KHOUADJA, S., AMINA, B. and FRANCOIS, G. Selection of lactic acid bacteria as candidate probiotics and in vivo test on *Artemianauplii*. *Aquaculture Environment Interactions*. 2014, 22(2), p. 699-709.

FARJAS, Pilar. *Revista Española Salud Publica Sobre alimentos funcionales*. ND. Jun. 2003, 77(3), p. 313-316.

FERNÁNDEZ-VILLA, K., CHANCI-ECHEVERRI, I. y WILCHES-LÓPEZ, L. Caracterización de los metabolitos de bacterias ácido lácticas y efecto inhibidor de las bacteriocinas en microorganismos patógenos en alimentos: revisión sistemática de la literatura 2008-2012. *Biosalud*, 2014, 13(1), p. 45-61.

FONTANA, C., COCCONCELLI, P., VIGNOLO, G. and SAAVEDRA, L. Occurrence of antilisterial structural bacteriocin genes in meat borne lactic acid bacteria. *Food Control*. 2015, 47, p. 53-59.

FRANCO P, RAMÍREZ L, OROZCO M, LÓPEZ L. Determinación de *Escherichia coli* e identificación del serotipo O157:H7 en carne de cerdo comercializada en los principales supermercados de la ciudad de Cartagena. *Revista Lasallista de Investigación*. 2013, 10

(1): 91-100.

GÄNZLE, M. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentation and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2015, 2, p. 106-117.

GHANBARI M, JAMI M, DOMIG K, KNEIFEL, W. Sea food biopreservation by lactic acid bacteria—a review. *LWT-Food Science and Technology*. 2013; 54 (2): 315-324.

GRAZIOTTI, G., RODRÍGUEZ-MELENDEZ, J., RÍOS, C., AFFRICANO, N., PALTNEGHI, A. y BOSCO, A. Influencia de la estructura muscular y del sitio de toma de muestras sobre parámetros que evalúan la calidad de la carne de cerdo. *Revista Argentina de Producción Animal*, 2014, 34(1), p. 63-67.

HAASE, J., DIDELOT, X., LECUIT, M., KORKEALA, H. y ACHTMAN, M. The ubiquitous nature of *Listeria monocytogenes* clones: a large-scale Multifocus Sequence Typing study. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(2), p. 405-416.

HAZEN, Ruz. Inocuidad Alimentaria. *Revista Industria Alimentaria*. 2013, 24(10), 12 – 20 p.

ICA Instituto Colombiano Agropecuario. Reglamentación sobre las condiciones sanitarias y de inocuidad en la producción primaria de ganado bovino y porcino. 2010, Citado: 24 enero de 2015, en: <http://www.ica.gov.co/getdoc/016f3c96-a458-4fa6-ae96-41d18b2221f5/Requisitos-Sanitarios-y-de-Inocuidad-en-la-Producc.aspx>

ICONTEC, Norma Técnica Colombiana 4565. 2010. Carne y productos cárnicos. Determinación del contenido de nitritos (método de referencia). Bogotá. 13 p.

JURADO-GÁMEZ, H., CALPA-YAMA, F. y CHASPUENGAL-TULCÁN, A. Determinación in vitro de la acción probiótica de *Lactobacillus plantarum* sobre *Yersinia pseudotuberculosis* aislada de *Cavia porcellus*. *Revista Facultad Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 2014, 61(3), p. 241-257.

JURADO-GÁMEZ, H. Evaluación *in vivo* de *Lactobacillus plantarum* como alternativa al uso de

- antibióticos en lechones. Revista MVZ Córdoba. 2013, 18(supl), p. 3648-3657.
- JURADO-GÁMEZ H, GUZMÁN-INSUASTY M, JARRÍN-JARRÍN V. Determinación de la cinética, pruebas de crecimiento y efecto de inhibición in vitro de *Lactobacillus lactis* en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*. Rev. Med. Vet. Zoot. 2015a, 62 (2): 40-56.
- JURADO-GÁMEZ H, GUZMÁN-INSUASTY M. Determinación de la cinética, pruebas de crecimiento y efecto de inhibición in vitro de *Lactobacillus casei* en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*. Rev. Med. Vet. Zoot. 2015b, 62 (2): 23-39.
- JURADO-GÁMEZ, H., RAMÍREZ, C. y AGUIRRE, D. Cinética de fermentación de *Lactobacillus plantarum* en un medio de cultivo enriquecido como potencial probiótico. Veterinaria y Zootecnia. 2013a, 7(2), p. 37-53.
- JURADO, H, MONTALVO, C y RAMÍREZ, C. Efecto de bioconservación de carne molida de cerdo, tipo hamburguesa con *Lactobacillus acidophilus* cepa ATCC 4356 y *Staphylococcus carnosus* NRRLO2. Revista de la asociación colombiana de ciencia y tecnología de alimentos. 2013b, 33 (16), p. 154.
- KARLSKAS, I., MAUDAL, K., AXELSSON, L., RUD, I., EIJSINK, V. and MATHIESEN. Heterologous protein secretion in lactobacilli with modified pSIP vectors. PLOS one. 2013, 9 (3), p. e91125.
- KIU, Elizabeth. ALIMENTARIA. Revista de Tecnología e higiene de los alimentos. EyPASA ESPAÑA. 2012. 58(4), p. 23-35.
- LANARA. Laboratorio de referencia animal: métodos analíticos oficiales para control de productos de origen animal e seus ingredients. Ii- Métodos físico e químicos. Brasilia (Brasil): Ministério da Agricultura, 2(25), 1981, p. 1-15.

- LOWRY, O., ROSEBROUG, N., FAR, A. and RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193, p. 265-75.
- MALDONADO-LOZANO, J. Nuevos ingredientes en la formulación para lactantes nacidos a término (I): probióticos, prebióticos y simbióticos. *Acta Pediatr Esp*, 2014, 72 (3), p. 56-62.
- MARTÍN-POZO, A., ARANA, D., FUENTES, M. y ALÓS, J. Sensibilidad a azitromicina y otros antibióticos en aislados recientes de *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2014, 32(6), p. 369-371.
- MEMBRÉ, J., BASSET, J. y GORRIS, L. Applying the food safety objective and related standards to thermal inactivation of *Salmonella* in poultry meat. *Journal of Food Protection*. 2007, 70, p. 2036-2044.
- MONTVILLE T, MATTHEWS K. *Microbiología de alimentos: introducción*. New Jersey: EEUU. Editorial acribia. 2009.
- PALANCA, V; RODRÍGUEZ, E; SEÑORÁNS, J y REGLERO, G. *Nutrición Hospitalaria*. Bases científicas para el desarrollo de productos cárnicos funcionales con actividad biológica combinada. 2006, 21(2), 199-202.
- PÉREZ-GUERRA, N. Modeling the batch bacteriocin production system by lactic acid bacteria by using modified three-dimensional Lotka-Volterra. *Biochemical Engineering Journal*. 2014, 88, p. 115-130.
- PRASAD, M. Expression studies of *Lactobacillus acidophilus* dnaK gene under different physical and chemical stress condition. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 2013, 2(11), p. 261-265.
- QUIROGA, G. *Calidad y cortes de la canal bovina para el mercado interno y exigencias internacionales*. Bogotá, Colombia. 2005, p. 245.

- RAMÍREZ, M. Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos [Tesis Licenciado Químico en Alimentos]. Pachuca de Soto (México): Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 2005, 89 p.
- RAJARAM G, MANIVASAGAN P, THILAGAVATHI B, SARAVANAKUMAR A. Purification and Characterization of a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus lactis* Isolated from Marine Environment. *Advance Journal of Food Science and Technology* 2010, 2(2), p. 138-144.
- RAMÍREZ-ROMERO, G.; REYES-VELAZQUEZ, M. y CRUZ-GUERRERO, A. Estudio del Nejayote como medio de crecimiento de probióticos y producción de bacteriocinas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 2013, p. 463-471.
- RIVERA, A. Calidad de la carne fresca. Departamento industria pecuaria UPR-RUM-CCA. 2004. p. 134.
- RODRÍGUEZ, L., BUENO, G., RODRÍGUEZ, D., SERRANO, P. and BRIZUELA, M. True and apparent maintenance coefficient and their significance on fermentation kinetics. *New Horizons Biotechnology*, 2003, p. 163-162.
- RODRÍGUEZ, J. APLICACIONES DE LOS ENTEROCOCOS EN LOS QUESOS ALIMENTARIA. *Revista de Tecnología e higiene de los alimentos. EyPASA ESPAÑA*. 2011, 46(2), p.345-356.
- SANKAR N, PRIYANKA D, REDDY P, RAJANIKANTH P, KUMAR K, INDIRA M. Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* Isolated from Cow Milk. *Inter. J. Microbiol. Res.* 2012; 3(2):133-137.
- SÁNCHEZ, A; GASTÓN, R; TORRESCANO, U; CAMOU, J; GONZÁLEZ, N y HERNÁNDEZ, G. Sistemas combinados de conservación para prologar la vida útil de la

- carne y los productos cárnicos. Revista NACAMEH. 2008, 2(2), p 124-159.
- SAEZ-LARA, M., GÓMEZ-LLORENTE, C., PLAZA-DÍAZ, J. and GIL, A. The role of probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria in the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and other related diseases. BioMed Research International, 2015, p. 1-15.
- SPARO M, CONFALONIERI A, URBIZU L, CECI M, Sánchez S. Bio-preservation of ground beef meat by *Enterococcus faecalis* CECT7121. Brazilian Journal of Microbiology. 2013, 44 (1): 43-49.
- SAS Institute Inc. 2004. SAS/STAT<sup>®</sup> 9.1 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc. 5136 p.
- SUMANO H y OCAMPO C. Farmacología Veterinaria. Mexico: MC GRAW HILL. 1993. p. 567.
- TAGG, J. y MCGIVEN, A. Assay system for Bacteriocins. Appl. Environ. Microb. Vol. 21. No. 5. 1971. p. 943.
- TERRENCE, M. y FERREIDON, S. Phenolic Compounds in Foods and Natural Health Products, Chapter 8 ACS Symposium. 2005, Series, Volume 909, p. 83-93.
- VALLEJO, M., LEDESMA, P., ANSELMINO, L. y MARGUET, E. Efecto de la condición de crecimiento y composición del medio de cultivo sobre la producción de bacteriocina de *Enterococcus mundtii* Tw56. Revista Colombiana de Biotecnología, 2014, 15(2), p. 174-179.
- VÁSQUEZ, S, SUÁREZ, H, ZAPATA, S. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. Rev. Chil. Nutr. 2009; 36 (1), p. 34-38.
- VEGAS, C., PICHUHA, B., PEÑA, C. y ZAVALA, A. Efecto simbiótico del extracto de

*Smallanthus son chifolius* (yacón) y *Lactobacillus plantarum* frente a *Escherichia coli*.

Ciencia e Investigación. 2013, 16(2), p. 77-82.

VISIKILI, A., GROUTA, A., TASSOU, C., NYCHAS, G. and PANAGOUE, E. Inoculated fermentation of green olives with potential probiotic *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures isolated from industrially fermented olives. Food Microbiology. 2014, 38, p.208-218.

WIJNKER J, WEERTS E, BREUKINK E, HOUBEN J, LIPMAN L. Reduction of *Clostridium* spore germination and growth in natural sausage casing using nisin. Food microbiology. 2011, 28 (5), p. 974-979.



# ANEXOS

**Anexo A. Instrucciones de uso para microorganismos KWIK-STIK™**

- En cámara de flujo laminar tipo II. junto al mechero. y después de dejar que la bolsa KWIK-STIK™ sin abrir se equilibre temperatura ambiente. abrir la bolsa por la muesca y retirar la unidad KWIK-STIK™.
- Tirar de la lengüeta para retirar la etiqueta y colocar en la placa del cultivo principal el registro de control de calidad.
- Apretar (una sola vez) la ampolla en la parte superior de KWIK-STIK™ (justo por debajo del menisco de líquido de la ampolla) situado en la tapa para liberar el líquido hidratante.
- Sujetar en posición vertical y golpear sobre una superficie dura para facilitar el flujo de líquido a través del eje hacia la parte inferior de la unidad que contiene el sedimento. Dejar que el líquido hidratante fluya a través del eje del hisopo y hacia la parte inferior de la unidad que contiene el sedimento.
- Apretar en la parte inferior de la unidad. triturando el sedimento en el líquido hasta que la suspensión del sedimento sea homogénea.
- De Inmediato. saturar bien el hisopo en el material hidratado y transferir a las cajas petri con el agar nutritivo.
- Inocular la placa del cultivo principal haciendo rodar el hisopo con suavidad sobre un tercio de la placa.
- Utilizando una asa estéril. crear vetas para facilitar el aislamiento de colonias.

De Inmediato. llevar a incubar las cajas petri con el cultivo principal inoculado a 37°C por 24 horas.

## **Anexo B. Método de Dubois**

Mediante la utilización del reactivo antrona, permite la determinación de componentes importantes como hexosas, aldopentosas y ácidos hexourónicos, bien sea que estén libres o formando parte de los polisacáridos. La lectura de las muestras se hace a una absorbancia máxima a 625 nm.

**Reactivos:** antrona, ácido sulfúrico 10% y 96%, glucosa anhidro

**Lavado de vidriería con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10%.** Se dejan en remojo los tubos de ensayo con el mismo ácido por 24 horas, luego se desocupan y se dejan invertidos para su secado por lo menos 3 horas.

### **Curva Estándar**

**Preparación del reactivo de antrona:** disolver 200mg (0.2 g) de antrona en 100 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 96% en un balón aforado y conservarlo cubierto con papel aluminio.

**Solución Madre:** Disolver 1.25 g de glucosa anhidra en un balón aforado de 250 ml, hasta completar su volumen con agua destilada y esterilizada.

**Solución estándar:** De la solución madre transferir 1 ml en un balón aforado de 100ml, hasta completar su volumen con agua destilada y esterilizada.

**Dilución patrón:** se establece una curva estándar de 0 a 50 mg/L, después de efectuar una dilución de 1/10 de la solución madre (500 mg/L), depositar en una serie de tubos 0-0.25-0.50-0.75-1.0-1.25-1.50-1.75-2.0-2.5 ml de la solución madre y completar a 2.5 ml con agua destilada.

### **Adición de la antrona**

- Se depositan 5 ml de la solución preparada en cada dilución (3 tubos) de los diferentes tubos. Estos tubos se colocan perpendiculares en un recipiente con abundante hielo y agua, el tiempo máximo de permanencia en este son 2 minutos.

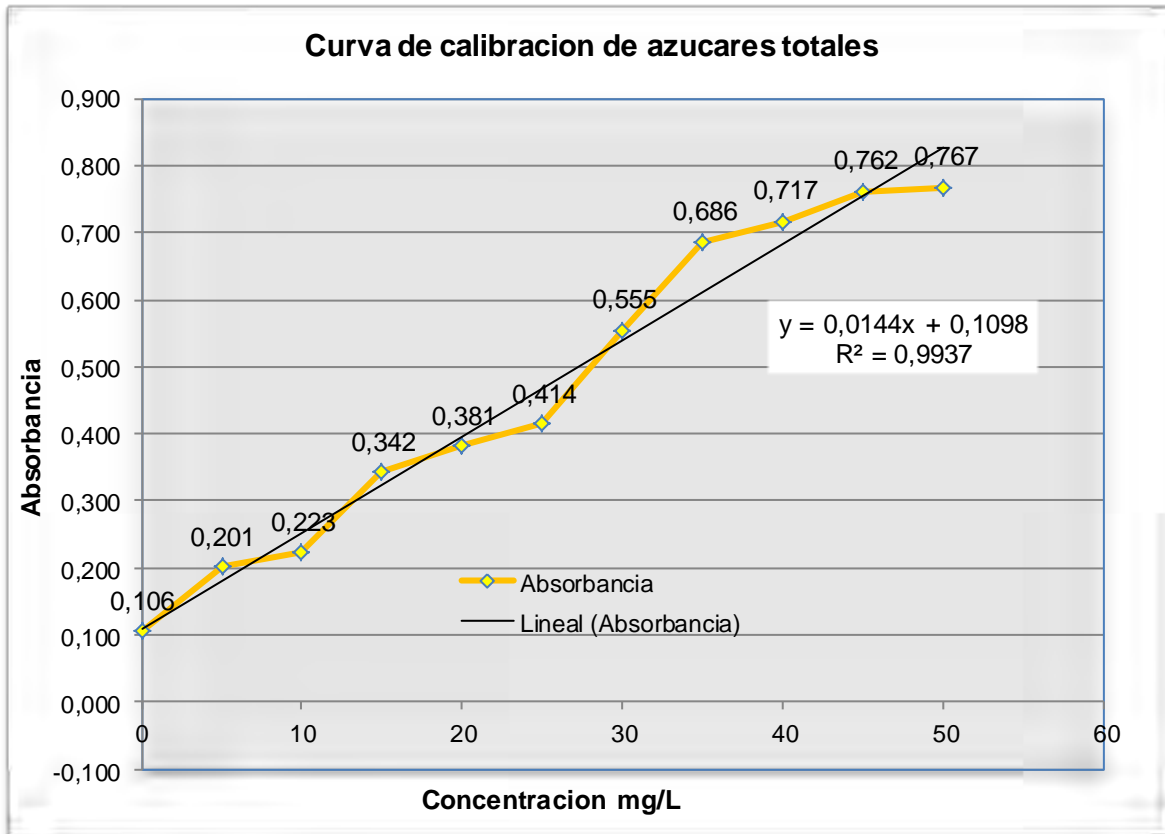
- Agitar en un vortex continuamente hasta homogenizar la solución.
- Llevar a ebullición por 10 minutos todos los tubos al mismo tiempo.
- Enfrían posteriormente en un recipiente con abundante hielo y agua. el tiempo máximo de permanencia en este son 2 minutos.
- Agitar en un vortex y esperar 15 minutos para eliminar las burbujas de aire y el empañamiento de los tubos.
- Llevar a lectura al espectrofotómetro a 625 nm en un periodo máximo de 30 minutos.
- El blanco se lee por duplicado. El blanco es 2.5 ml de agua destilada.

#### **Procedimiento para azúcares totales para la muestra a evaluar**

- Tanto la curva estándar como las muestras a dosificar sufren el mismo tratamiento. más la dosificación de azúcares totales es realizada sobre 2.5 ml de muestra convenientemente diluida conservados en congelación.
- Para las muestras de azúcares se hacen diluciones  $10^{-1}$ .  $10^{-2}$ .  $10^{-3}$ .  $10^{-4}$  de cualquiera de las muestras obtenidas en los diferentes tiempos de la cinética en agua destilada. filtrada y estéril para correr densidad óptica.
- Se escoge la dilución a trabajar que La densidad óptica se encuentre entre 0 y 1. si se pasa se debe diluir.
- Entonces ya escogida la dilución a trabajar se lleva cada dilución de cada tiempo de la cinética a esta dilución.
- Una vez hechas las diluciones se procede a tomar de cada una de ellas 2.5 ml de la muestra y se los deposita en un tubo de ensayo (que también debe haber sido lavado previamente con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% durante toda la noche).

- Posteriormente a esta muestra de 2.5 ml se le deposita 5 ml de la solución de antrona ya preparada anteriormente y se sigue el mismo procedimiento que en la curva estándar.
- El blanco se prepara con 2.5 ml de agua destilada más 5 ml del reactivo de antrona.

### Anexo C. Curva patrón para determinación de azúcares totales (método de antrona)



#### Ecuación curva estándar

La condición general para aplicar la ecuación de la recta debe considerar que el coeficiente de determinación sea  $(R^2) > 0.99$ .

$$y = mX + b$$

Y = absorbancia

m= pendiente

X = concentración (mg de azúcar/L)

b = ordenada al origen

**Lectura de absorbancia para diferentes concentraciones de azúcar mg/L**

Tiempo	Concentración	Absorbancia
0	0	0.106
1	5	0.201
2	10	0.223
3	15	0.342
4	20	0.381
5	25	0.414
6	30	0.555
7	35	0.686
8	40	0.717
9	45	0.762
10	50	0.767

**Anexo D. Lecturas de absorbancia para el consumo de azúcar total de las dos cepas**

Tiempo (horas)	Medios de cultivo			
	<i>L. plantarum</i>		<i>L. lactis</i>	
	X	Y	X	Y
0	5.98	0.989	5.95	0.981
2:24	5.186	0.856	4.86	0.813
4:48	4.948	0.823	4.84	0.807
7:12	4.718	0.792	4.77	0.801
9:36	4.274	0.723	4.03	0.693
12:00	3.488	0.613	3.49	0.615
14:24	3.138	0.567	2.18	0.423
16:48	2.872	0.523	2.39	0.453
19:12	2.734	0.501	1.75	0.362
21:36	2.592	0.483	0.77	0.221
24	1.79	0.382	0.13	0.128

X: Concentración de azúcar (mg/L)

Y: absorbancia en el medio MRS

**Ecuación:**  $X = \frac{y - b}{m} * Dilución / 1000 \text{ mg}$

m=0.0144 y b=0.1098

Dilución: Medio MRS 1/1000



### Anexo D. Análisis estadístico.

análisis estadístico

Procedimiento Mixed

#### Model Information

Conj. datos	WORK.VERÓNICA
Variable dependiente	LNPLAN
Estructuras de covarianza	Variance Components. Symmetric compound
Efecto de asunto	UE(TRAT)
Método de estimación	REML
Método de varianza del residual	Perfil
Método SE de efectos fijos	Basado en el modelo
Método de grados de libertad	Contención

#### Información de nivel de clase

Class	Levels	Values
	TRAT	2 MRS PRO
	UE	3 1 2 3
	TIEMPO	7 0 1 2 3 4 5 6

#### Dimensions

Parámetros de covarianza	3
Columnas en X	24
Columnas en Z	6
Asuntos	1
Obs máx por asunto	42
Observaciones utilizadas	42
Observaciones no utilizad	0
Observaciones totales	42

#### Estimadores de parámetro de covarianza

Cov Parm	Subject	Estimador
		UE(TRAT) 0.4549
		SIM(1) UE(TRAT) -0.06779
		Residual 3.6950

#### Fit Statistics

Verosimilitud -2 Res Log	134.0
AIC (mejor más pequeño)	140.0
AICC (mejor más pequeño)	141.0

análisis estadístico

Procedimiento Mixed

Fit Statistics

BIC (mejor más pequeño) 139.4

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
TRAT	1	4	10.34	0.0324
TIEMPO	6	24	33.87	<.0781
TRAT*TIEMPO	6	24	6.22	0.0987

Least Squares Means

Error

Effect	TRAT	TIEMPO	Estimador	estándar	DF	Valor t	Pr >  t
TRAT	MRS		20.2014	0.5552	4	36.39	<.0001
TRAT	PRO		22.7267	0.5552	4	40.94	<.0001
TIEMPO		0	16.4317	0.8317	24	19.76	<.0001
TIEMPO		1	16.1467	0.8317	24	19.42	<.0001
TIEMPO		2	19.3483	0.8317	24	23.26	<.0001
TIEMPO		3	22.1950	0.8317	24	26.69	<.0001
TIEMPO		4	23.1733	0.8317	24	27.86	<.0001
TIEMPO		5	27.6317	0.8317	24	33.22	<.0001
TIEMPO		6	25.3217	0.8317	24	30.45	<.0001
TRAT*TIEMPO	MRS	0	15.6933	1.1761	24	13.34	<.0001
TRAT*TIEMPO	MRS	1	15.4433	1.1761	24	13.13	<.0001
TRAT*TIEMPO	MRS	2	14.8267	1.1761	24	12.61	<.0001
TRAT*TIEMPO	MRS	3	19.5200	1.1761	24	16.60	<.0001
TRAT*TIEMPO	MRS	4	21.4567	1.1761	24	18.24	<.0001
TRAT*TIEMPO	MRS	5	28.0100	1.1761	24	23.82	<.0001
TRAT*TIEMPO	MRS	6	26.4600	1.1761	24	22.50	<.0001
TRAT*TIEMPO	PRO	0	17.1700	1.1761	24	14.60	<.0001
TRAT*TIEMPO	PRO	1	16.8500	1.1761	24	14.33	<.0001
TRAT*TIEMPO	PRO	2	23.8700	1.1761	24	20.30	<.0001
TRAT*TIEMPO	PRO	3	24.8700	1.1761	24	21.15	<.0001
TRAT*TIEMPO	PRO	4	24.8900	1.1761	24	21.16	<.0001
TRAT*TIEMPO	PRO	5	27.2533	1.1761	24	23.17	<.0001
TRAT*TIEMPO	PRO	6	24.1833	1.1761	24	20.56	<.0001

## análisis estadístico

Procedimiento Mixed

## Model Information

Conj. datos	WORK.VERÓNICA
Variable dependiente	LNLAC
Estructuras de covarianza	Variance Components. Autoregressive
Efecto de asunto	UE(TRAT)
Método de estimación	REML
Método de varianza del residual	Perfil
Método SE de efectos fijos	Basado en el modelo
Método de grados de libertad	Contención

## Información de nivel de clase

Class	Levels	Values
TRAT	2	MRS PRO
UE	3	1 2 3
TIEMPO	7	0 1 2 3 4 5 6

## Dimensions

Parámetros de covarianza	3
Columnas en X	24
Columnas en Z	6
Asuntos	1
Obs máx por asunto	42
Observaciones utilizadas	42
Observaciones no utilizad	0
Observaciones totales	42

## Estimadores de parámetro de covarianza

Cov Parm	Subject	Estimador	
		UE(TRAT)	0.8472
		AR(1) UE(TRAT)	0.4629
		Residual	3.0332

## Fit Statistics

AIC (mejor más pequeño)	Verosimilitud -2 Res Log	122.7
	128.7	
	AICC (mejor más pequeño)	129.7

análisis estadístico 14:18 Tuesday, February 17, 2004 62

Procedimiento Mixed

Fit Statistics

BIC (mejor más pequeño) 128.1

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
TRAT	1	4	1.93	0.2371
TIEMPO	6	24	38.59	<.0001
TRAT*TIEMPO	6	24	8.25	<.0001

Least Squares Means

Error

Effect	TRAT	TIEMPO	Estimador	estándar	DF	Valor t	Pr >  t
TRAT	MRS		20.7433	0.7809	4	26.56	<.0001
TRAT	PRO		22.2776	0.7809	4	28.53	<.0001
TIEMPO		0	13.5917	0.8042	24	16.90	<.0001
TIEMPO		1	18.2650	0.8042	24	22.71	<.0001
TIEMPO		2	22.5900	0.8042	24	28.09	<.0001
TIEMPO		3	26.7267	0.8042	24	33.23	<.0001
TIEMPO		4	26.5283	0.8042	24	32.99	<.0001
TIEMPO		5	21.0183	0.8042	24	26.14	<.0001
TIEMPO		6	21.8533	0.8042	24	27.17	<.0001
TRAT*TIEMPO	MRS	0	15.5200	1.1373	24	13.65	<.0001
TRAT*TIEMPO	MRS	1	15.6400	1.1373	24	13.75	<.0001
TRAT*TIEMPO	MRS	2	19.5200	1.1373	24	17.16	<.0001
TRAT*TIEMPO	MRS	3	25.6600	1.1373	24	22.56	<.0001
TRAT*TIEMPO	MRS	4	25.5233	1.1373	24	22.44	<.0001
TRAT*TIEMPO	MRS	5	21.5200	1.1373	24	18.92	<.0001
TRAT*TIEMPO	MRS	6	21.8200	1.1373	24	19.19	<.0001
TRAT*TIEMPO	PRO	0	11.6633	1.1373	24	10.26	<.0001
TRAT*TIEMPO	PRO	1	20.8900	1.1373	24	18.37	<.0001
TRAT*TIEMPO	PRO	2	25.6600	1.1373	24	22.56	<.0001
TRAT*TIEMPO	PRO	3	27.7933	1.1373	24	24.44	<.0001
TRAT*TIEMPO	PRO	4	27.5333	1.1373	24	24.21	<.0001
TRAT*TIEMPO	PRO	5	20.5167	1.1373	24	18.04	<.0001
TRAT*TIEMPO	PRO	6	21.8867	1.1373	24	19.24	<.0001

análisis estadístico

Procedimiento Mixed

Model Information

Conj. datos	WORK.VERÓNICA
Variable dependiente	pHplan
Estructuras de covarianza	Variance Components. Autoregressive
Efecto de asunto	UE(TRAT)
Método de estimación	REML
Método de varianza del residual	Perfil
Método SE de efectos fijos	Basado en el modelo
Método de grados de libertad	Contención

Información de nivel de clase

Class	Levels	Values						
UE	3	<table border="0"> <tr> <td>TRAT</td> <td>2</td> <td>MRS PRO</td> </tr> <tr> <td>TIEMPO</td> <td>7</td> <td>0 1 2 3 4 5 6</td> </tr> </table>	TRAT	2	MRS PRO	TIEMPO	7	0 1 2 3 4 5 6
TRAT	2	MRS PRO						
TIEMPO	7	0 1 2 3 4 5 6						

Dimensions

Parámetros de covarianza	3
Columnas en X	24
Columnas en Z	6
Asuntos	1
Obs máx por asunto	42
Observaciones utilizadas	42
Observaciones no utilizad	0
Observaciones totales	42

Estimadores de parámetro de covarianza

Cov Parm	Subject	Estimador
		UE(TRAT) 0.000902
		AR(1) UE(TRAT) 0.01068
		Residual 0.009504

Fit Statistics

AIC (mejor más pequeño)	Verosimilitud -2 Res Log	-33.5
	-27.5	
	AICC (mejor más pequeño)	-26.5

análisis estadístico

Procedimiento Mixed

Fit Statistics

BIC (mejor más pequeño) -28.1

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
TRAT	1	4	6.44	0.0641
TIEMPO	6	24	179.12	<.0001
TRAT*TIEMPO	6	24	10.04	<.0001

Least Squares Means

Error	Effect	TRAT	TIEMPO	Estimador	estándar	DF	Valor t	Pr >  t
	TRAT	MRS		4.9529	0.02760	4	179.45	<.0001
	TRAT	PRO		5.0519	0.02760	4	183.04	<.0001
	TIEMPO		0	5.6550	0.04165	24	135.79	<.0001
	TIEMPO		1	5.6200	0.04165	24	134.94	<.0001
	TIEMPO		2	5.3650	0.04165	24	128.82	<.0001
	TIEMPO		3	4.8667	0.04165	24	116.86	<.0001
	TIEMPO		4	4.6200	0.04165	24	110.93	<.0001
	TIEMPO		5	4.4733	0.04165	24	107.41	<.0001
	TIEMPO		6	4.4167	0.04165	24	106.05	<.0001
	TRAT*TIEMPO	MRS	0	5.5833	0.05890	24	94.80	<.0001
	TRAT*TIEMPO	MRS	1	5.6333	0.05890	24	95.65	<.0001
	TRAT*TIEMPO	MRS	2	5.4967	0.05890	24	93.33	<.0001
	TRAT*TIEMPO	MRS	3	4.9167	0.05890	24	83.48	<.0001
	TRAT*TIEMPO	MRS	4	4.5567	0.05890	24	77.37	<.0001
	TRAT*TIEMPO	MRS	5	4.3000	0.05890	24	73.01	<.0001
	TRAT*TIEMPO	MRS	6	4.1833	0.05890	24	71.03	<.0001
	TRAT*TIEMPO	PRO	0	5.7267	0.05890	24	97.23	<.0001
	TRAT*TIEMPO	PRO	1	5.6067	0.05890	24	95.19	<.0001
	TRAT*TIEMPO	PRO	2	5.2333	0.05890	24	88.86	<.0001
	TRAT*TIEMPO	PRO	3	4.8167	0.05890	24	81.78	<.0001
	TRAT*TIEMPO	PRO	4	4.6833	0.05890	24	79.52	<.0001
TRAT*TIEMPO	PRO	5	4.6467	0.05890	24	78.89	<.0001	
	TRAT*TIEMPO	PRO	6	4.6500	0.05890	24	78.95	<.0001

análisis estadístico

Procedimiento Mixed

Model Information

Conj. datos	WORK.VERÓNICA
Variable dependiente	pHlactis
Estructuras de covarianza	Variance Components. Autoregressive
Efecto de asunto	UE(TRAT)
Método de estimación	REML
Método de varianza del residual	Perfil
Método SE de efectos fijos	Basado en el modelo
Método de grados de libertad	Contención

Información de nivel de clase

Class	Levels	Values						
UE	3	<table border="0"> <tr> <td>TRAT</td> <td>2</td> <td>MRS PRO</td> </tr> <tr> <td>TIEMPO</td> <td>7</td> <td>0 1 2 3 4 5 6</td> </tr> </table>	TRAT	2	MRS PRO	TIEMPO	7	0 1 2 3 4 5 6
TRAT	2	MRS PRO						
TIEMPO	7	0 1 2 3 4 5 6						

Dimensions

Parámetros de covarianza	3
Columnas en X	24
Columnas en Z	6
Asuntos	1
Obs máx por asunto	42
Observaciones utilizadas	42
Observaciones no utilizad	0
Observaciones totales	42

Estimadores de parámetro de covarianza

Cov Parm	Subject	Estimador	
		UE(TRAT)	0.002016
		AR(1)	UE(TRAT) 0.1813
		Residual	0.001911

Fit Statistics

AIC (mejor más pequeño)	Verosimilitud -2 Res Log	-73.8
	-67.8	
	AICC (mejor más pequeño)	-66.8

análisis estadístico

Procedimiento Mixed

Fit Statistics

BIC (mejor más pequeño) -68.4

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
TRAT	1	4	41.37	0.0030
TIEMPO	6	24	790.27	<.0001
TRAT*TIEMPO	6	24	15.31	<.0001

Least Squares Means

Error	Effect	TRAT	TIEMPO	Estimador	estándar	DF	Valor t	Pr >  t
TRAT	MRS		4.8790	0.02822	4	172.90	<.0001	
	TRAT	PRO		5.1357	0.02822	4	182.00	<.0001
	TIEMPO		0	5.6383	0.02558	24	220.39	<.0001
TIEMPO		1	5.6833	0.02558	24	222.15	<.0001	
	TIEMPO		2	5.3883	0.02558	24	210.62	<.0001
	TIEMPO		3	4.9050	0.02558	24	191.73	<.0001
	TIEMPO		4	4.6217	0.02558	24	180.65	<.0001
	TIEMPO		5	4.4450	0.02558	24	173.75	<.0001
	TIEMPO		6	4.3700	0.02558	24	170.82	<.0001
	TRAT*TIEMPO	MRS	0	5.4300	0.03618	24	150.08	<.0001
	TRAT*TIEMPO	MRS	1	5.4833	0.03618	24	151.56	<.0001
	TRAT*TIEMPO	MRS	2	5.1767	0.03618	24	143.08	<.0001
	TRAT*TIEMPO	MRS	3	4.7933	0.03618	24	132.49	<.0001
	TRAT*TIEMPO	MRS	4	4.5400	0.03618	24	125.48	<.0001
	TRAT*TIEMPO	MRS	5	4.4000	0.03618	24	121.61	<.0001
	TRAT*TIEMPO	MRS	6	4.3300	0.03618	24	119.68	<.0001
	TRAT*TIEMPO	PRO	0	5.8467	0.03618	24	161.60	<.0001
	TRAT*TIEMPO	PRO	1	5.8833	0.03618	24	162.61	<.0001
	TRAT*TIEMPO	PRO	2	5.6000	0.03618	24	154.78	<.0001
	TRAT*TIEMPO	PRO	3	5.0167	0.03618	24	138.66	<.0001
	TRAT*TIEMPO	PRO	4	4.7033	0.03618	24	130.00	<.0001
	TRAT*TIEMPO	PRO	5	4.4900	0.03618	24	124.10	<.0001
	TRAT*TIEMPO	PRO	6	4.4100	0.03618	24	121.89	<.0001



### **Anexo F. Artículos Y Ponencias**

Los resultados preliminares de este trabajo de Maestría se han presentado en los siguientes congresos y publicaciones:

CRECIMIENTO DE *L. plantarum* y EFECTO SOBRE *E. coli*, *S. typhimurium*, *C. perfringens*, y *S. aureus*. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial Vol 13 No. 2 (57-66) julio - diciembre 2015 INDEXADA A2

CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Lactobacillus lactis* Y DETERMINACIÓN DEL EFECTO PROBIÓTICO EN CEPAS PATÓGENAS, Vol 14(2) 2015. revista Biosalud. INDEXADA A2

EFECTO DEL SOBRENADANTE DE *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus lactis* EN LOMO DE CERDO (*Longissimus dorsi*). Revista de La Salle, aceptado para publicación.

#### **Ponencias:**

XIII ENCUENTRO NACIONAL Y VI INTERNACIONAL DE INVESTIGADORES DE LAS CIENCIAS PECUARIAS. Medellin.

**Productos asociados a la ponencia.**

- *Nombre del producto:* PARÁMETROS CINÉTICOS Y EFECTO PROBIÓTICO DE *Lactobacillus plantarum* SOBRE *Escherichia coli* Y *Salmonella typhimurium*.  
Presentación de trabajo - Ponencia
- *Nombre del producto:* Parámetros cinéticos y efecto probiótico de *Lactobacillus lactis* sobre *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus*. Presentación de trabajo –  
Ponencia.