

**Efecto de conservantes derivados de la
fermentación láctica de azúcares y
comparación de dos modelos predictivos en el
crecimiento de *Listeria* sp. en salchichas de
pollo**

Dulce Yanira del Cid Alvarez

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2018

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Efecto de conservantes derivados de la
fermentación láctica de azúcares y
comparación de dos modelos predictivos en el
crecimiento de *Listeria* sp. en salchichas de
pollo**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Dulce Yanira del Cid Alvarez

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2018

Efecto de conservantes derivados de la fermentación láctica de azúcares y comparación de dos modelos predictivos en el crecimiento de *Listeria* sp. en salchichas de pollo

Dulce Yanira del Cid Alvarez

Resumen. Los conservantes a base de fermentación ácido láctica surgen como una alternativa natural en la conservación de alimentos. Su acción bacteriostática permite utilizarlos en el control del crecimiento bacteriano en productos refrigerados listos para el consumo. Los objetivos de este estudio fueron; evaluar la aplicación de cinco conservantes en salchichas de pollo almacenadas a 6 °C: para el análisis del efecto sobre el control de *Listeria monocytogenes*, el efecto sobre las características fisicoquímicas y microbiológicas asociadas al deterioro de salchichas de pollo, y comparar el crecimiento en placa de *Listeria innocua* contra dos modelos predictivos (Galactic y FSSP). El estudio se realizó en el laboratorio de investigación de la empresa Galactic ubicada en Bélgica. Se utilizó una dosis de las mezclas comerciales a base de lactato, acetato y diacetato; DN47 (0.5 y 0.3%), AN50 (0.5%), V100 (0.3%), DN4 (2.2%) e INBAC 10NA (0.3%), en un Diseño Completamente al Azar con 4 repeticiones, y medidas repetidas en el tiempo al día 0, 7, 14, 21 y 28. Las muestras fueron analizadas mediante un análisis de varianza y separación de medias por cuadrados mínimos ($P < 0.05$). Se evaluaron las muestras para color, pH, humedad, actividad de agua, conteo de mesófilos aerobios y bacterias ácido lácticas. Se incluyó una prueba desafío con dos concentraciones iniciales de *Listeria innocua*. Los conservantes no generan cambios estadísticamente significativos en las características fisicoquímicas ($P > 0.05$), tienen un efecto bacteriostático comparado con el control para mesófilos aerobios y bacterias ácido lácticas. Los modelos matemáticos de crecimiento bacteriano son estadísticamente distintos en cuanto a la predicción del desarrollo en Log UFC/g de *Listeria*. **Palabras clave:** Listos para el consumo, modelos matemáticos, natural.

Abstract. Preservatives based on lactic acid fermentation born as a natural alternative in food preservation. The bacteriostatic effect gives the opportunity to use it in bacteria growth control in refrigerated food ready to eat. The objectives of the study were evaluate the use of preservatives in chicken sausages storage under refrigeration at 6 °C: in order to evaluate the effect over control of *Listeria monocytogenes* growth, the effect on physicochemical and microbiological characteristics associated with shelf life in sausages and compare plate count and two predictive models (Galactic and FSSP). The study was made in the laboratories of Galactic located in Belgium. A dosage of the different commercial mixtures based in lactate, acetate and diacetate; DN47 (0.5 y 0.3%), AN 50 (0.5%), V100 (0.3%), DN4 (2.2%) and INBAC 10NA (0.3%), using a completely randomized design with four replicates. Samples were analyzed by ANOVA and LSMeans ($P < 0.05$), and measurements repeated in time at day 0, 7, 14, 21 and 28. Color, pH, moisture, water activity, aerobic plate count and lactic acid bacteria were evaluated, “challenge test” was inoculated with two initial concentrations of *L. innocua* (nonpathogenic). Preservatives caused no significant variation in physicochemical characteristics ($P > 0.05$), had a bacteriostatic effect compared with the control on aerobic plate count and lactic acid bacteria, being INBAC 10 NA the one that present better results on the last group. The mathematical models of bacterial growth are statistically different according to the prediction of the development Log CFU/g of *Listeria*.

Key words: Natural, predictive models, ready to eat.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
4. CONCLUSIONES	30
5. RECOMENDACIONES	31
6. LITERATURA CITADA.....	32
7. ANEXOS	36

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Descripción de los tratamientos.....	3
2. Formulación de la salchicha en porcentaje incluyendo los tratamientos propuestos.....	4
3. Resumen de la composición de los conservantes y dosis utilizadas.	5
4. Resumen de los datos de entrada para comparación de los modelos predictivos.	9
5. Cambios de pH en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días en refrigeración a 6 °C.	12
6. Cambios de humedad en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días en refrigeración a 6 °C.....	13
7. Actividad de agua en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.	14
8. Cambios en la variable L de color en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.	16
9. Cambios en la variable a* de color en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.	17
10. Cambios en la variable b* de color en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.	18
11. Cambios en la variable de intensidad de color (E) en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.	19
12. Conteo en logaritmos de mesófilos aerobios en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días en refrigeración (6 °C).	21
13. Conteo en logaritmos de bacterias ácido láctico en salchichas adicionadas con diferentes conservantes y almacenadas en refrigeración a 6 ° C.....	23
14. Conteo en logaritmos de <i>Listeria innocua</i> bajo prueba desafío con inoculación inicial de 3 Log UFC/g.	25
15. Conteo en logaritmos de <i>Listeria innocua</i> bajo prueba desafío con inoculación inicial de 1 Log UFC/g.	26
Figuras	Página
1. Flujo de proceso para la elaboración de las salchichas de pollo.	6
2. Resultados en modelo predictivo Galactic: comportamiento de <i>Listeria</i> con un inóculo inicial de 3 Log UFC/g en salchichas de pollo almacenadas en refrigeración a 6 °C.	28

Figuras	Página
3. Resultados en modelo predictivo FSSP: comportamiento de <i>Listeria</i> con un inóculo inicial de 3 Log UFC/g en salchichas de pollo almacenadas en refrigeración a 6 °C.	28
4. Comportamiento de <i>Listeria</i> con un inóculo inicial de 3 Log UFC/g en salchichas de pollo almacenadas en refrigeración a 6 °C en modelos predictivos Galactic y FSSP (Food Spoilage and Safety Predictor) y conteo en placa para el tratamiento control (sin conservantes).....	29

Anexos	Página
1. Especificaciones de empaque.	36
2. Comportamiento del pH en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.	36
3. Comportamiento de la humedad expresada en porcentaje (%) en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.	37
4. Comportamiento de la actividad de agua en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.	37
5. Cambio en la intensidad del color en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.	38
6. Comportamiento de las bacterias mesófilas aerobias en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.....	38
7. Comportamiento de las bacterias ácido lácticas en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.	39
8. Comportamiento de <i>L. innocua</i> en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.	39
9. Comportamiento de <i>L. innocua</i> en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.	40
10. Crecimiento bacteriano para los modelos predictivos y conteo en placa para el tratamiento DN47 (0.5 %) en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.	40
11. Crecimiento bacteriano para los modelos predictivos y conteo en placa para tratamiento AN50 (0.5 %) en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.	41
12. Crecimiento bacteriano para los modelos predictivos y conteo en placa para tratamiento DN47 (0.3%) en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.	41
13. Crecimiento bacteriano para los modelos predictivos y conteo en placa para tratamiento DN4 (2.2%) en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.	42
14. Crecimiento bacteriano para los modelos predictivos y conteo en placa para tratamiento V100 (0.3%) en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.	42

Anexos	Página
15. Distribución de datos para correlación entre modelos FSSP y Galactic	43
16. Distribución de datos para correlación entre modelo Galactic y conteo en placa.	43
17. Distribución de datos para correlación entre conteo en placa y modelo FSSP. ..	44

1. INTRODUCCIÓN

La vida útil de un alimento es el tiempo después de su producción que en condiciones controladas de almacenamiento y a pesar que sufre una pérdida de las propiedades sensoriales, fisicoquímicas y microbiológicas, todavía se considera apto para el consumo (Holley y Patel 2005). Los factores que influyen en la vida útil de los alimentos son, la naturaleza de la materia prima, la formulación del producto, el sistema de procesamiento al cual ha sido sometido, las condiciones sanitarias del proceso desde la entrada de materia prima, procesamiento, envase y almacenamiento hasta la distribución y manipulación por parte del consumidor final (Feiner 2006).

Para el análisis de la vida útil se pueden usar indicadores como bacterias o análisis fisicoquímico de cambios en las características sensoriales originales del alimento. Algunos de los indicadores de la vida útil de un producto alimenticio son: elevado número de microorganismos (bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales, coliformes fecales, presencia de patógenos fuera del rango permisible), oxidación de grasas, sinéresis y cambios sensoriales por actividades bacterianas o enzimáticas (Forsythe 2002). La predicción del deterioro del alimento se puede evaluar mediante un conteo de microorganismos al inicio y la detección al momento en que ésta sobrepasa la especificación sanitaria permisible según la norma vigente en un país específico o la norma internacional (Gram *et al.* 2002).

De acuerdo a Duret *et al.* (2014), los factores relacionados al crecimiento de microorganismos deterioradores en alimentos son: intrínsecos como el pH, Aw, nutrientes, humedad y antimicrobianos naturales. Los factores extrínsecos son la temperatura, tiempo y características del ambiente al que es expuesto, tratamientos tecnológicos que pueden ser térmicos, irradiación y aditivos. Mientras que los factores implícitos se relacionan a la velocidad específica de crecimiento, el sinergismo y antagonismo. Dentro de los microorganismos que pueden crecer en los alimentos se encuentran los patógenos.

De acuerdo al Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) cuando dos o más personas se enferman con el mismo alimento o bebida contaminada este evento es denominado brote de enfermedad transmitida por alimentos. En los últimos 25 años *Listeria monocytogenes* ha ido incrementando su importancia como uno de los patógenos asociados a enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) dadas su alta tasa de fatalidad de hasta el 30% de los casos (Schöbitz *et al.* 2009). Conocida como un patógeno asociado a episodios esporádicos y grandes brotes causando que la enfermedad sea reconocida alrededor del mundo (Jemmi y Stehan 2006; CDC 2017).

Además de la presencia de patógenos, los deterioradores de alimentos son importantes por los cambios que causan en las características sensoriales, afectando con ello la calidad de los productos (Gram *et al.* 2002). Las bacterias ácido lácticas (BAL) predominan como deterioradoras de productos cárnicos principalmente en alimentos almacenados en ausencia de oxígeno; empacados al vacío (Ossa *et al.* 2010).

Dentro de los métodos de conservación de alimentos se destacan los fisicoquímicos y microbiológicos, existiendo tecnologías emergentes como altas presiones e irradiación (Vaclavik y Christian 2014). Los conservantes son agentes antimicrobianos que se agregan a los productos con el fin de eliminar o prevenir el crecimiento de bacterias por un periodo determinado (Silva y Lidon 2016). El uso de estos para promover la seguridad alimentaria se ha vuelto un tema de interés debido a que las personas están más interesadas en productos listos para consumir (RTE, por sus siglas en inglés), más naturales y con menos químicos añadidos. Muchas industrias han creado departamentos de investigación y desarrollo de conservantes efectivos usados en dosis bajas que incluyen el estudio de diferentes factores como pH, actividad de agua (A_w), temperatura de almacenamiento, atmósferas controladas y la presencia de ingredientes bacteriostáticos (AINIA 2011) como es el caso de Galactic y los nuevos productos de la línea de derivados de la fermentación láctica para control de crecimiento bacteriano.

De acuerdo a Baranyi y Roberts (1994), los modelos microbiológicos predictivos combinan diferentes ramas de conocimiento como estadística, química, ingeniería informática y ecología microbiana para crear y desarrollar modelos que permitan predecir el comportamiento microbiano en un ambiente determinado. Estos modelos matemáticos describen el crecimiento, desarrollo, sobrevivencia y la inactivación o procesos bioquímicos de los microorganismos en los alimentos (Martínez 2016). Su interés comercial se basa en la demanda y riesgo involucrado en el consumo de productos contaminados.

Para este estudio se utilizaron salchichas cocidas RTE para evaluación de cambios fisicoquímicos y microbiológicos causados por la presencia de conservantes y para una prueba desafío que consiste en la inoculación voluntaria del alimento utilizando *Listeria innocua* (no patogénica) para comparar los resultados *in situ* y los obtenidos al usar los modelos predictivos de Galactic y FSSP (Food Spoilage and Safety Predictor, por sus siglas en inglés).

Los objetivos de este proyecto fueron:

- Evaluar el efecto de conservantes a base de lactato, acetato y diacetato en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en una formulación cárnica.
- Analizar las características fisicoquímicas y microbiológicas asociadas con la vida útil de las salchichas de pollo.
- Comparar dos modelos predictivos Galactic y FSSP para condiciones de desarrollo de *Listeria monocytogenes* combinado con una prueba desafío con *Listeria innocua*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del estudio.

El estudio se llevó a cabo en los laboratorios del área de Market and Development Food (MKDE F) del departamento de investigación y desarrollo de Galactic ubicado en Bruselas. Con sede central y planta de producción localizada en Place d'Escanaffles 23 en Bélgica. La temperatura de la planta de producción se mantuvo por debajo de 10 °C durante el proceso de elaboración de las salchichas y en almacenamiento a 6 °C. El proyecto tuvo una duración de 28 días.

Materia prima para la elaboración de los tratamientos.

Durante la evaluación se utilizaron salchichas de pollo adicionadas con conservantes derivados de la fermentación ácido láctica de azúcares. Los cuales están compuestos por mezclas de lactatos y diacetatos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos.

Tratamiento	Conservante añadido a la formulación en porcentaje (%)	Clave
1 Control	-	Control
2 Galimax Diace N47 P ⁵	0.50	DN47 ¹
3 Galimax Ace N50 P	0.50	AN50
4 Galimax Flavor V100 P	0.30	V100
5 Galimax Diace N4 L ⁴	2.20	DN4
6 Galimax Diace N47 P	0.30	DN47 ²
7 INBAC 10NA P	0.30	INBAC

⁵ Presentación en polvo. ⁴ Presentación en líquido. ¹ Concentración usada 0.5%.

² Concentración usada 0.3%. Galimax: nombre comercial, Diace: diacetato, Ace: acetato. INBAC: producto de la marca Peisa® con un contenido de 2% de nisina en la formulación.

La formulación utilizada para la elaboración de las salchichas de pollo se describe en el Cuadro 2, en el cual se incluyen los tratamientos a evaluar junto a su respectivo porcentaje. Además, en el Cuadro 3 se presenta un resumen de la composición de los conservantes y dosis utilizadas. El flujo de proceso se describe en la Figura 1.

Cuadro 2. Formulación de la salchicha en porcentaje incluyendo los tratamientos propuestos.

Ingredientes	Formulaciones en %						
	Control (%)	DN47 ¹ (%)	AN50 (%)	V100 (%)	DN4 (%)	DN47 ² (%)	INBAC 10NA (%)
Carne de pollo	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Pollo MDM	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00
Piel de pollo	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
Especias	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Sal (NaCl)	1.82	1.82	1.82	1.82	1.82	1.82	1.82
Sal de cura (0.06 % nitritos)	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33
Mezcla de fosfatos (Activate M97)	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Eritorbato de sodio	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Aislado de proteína de soya	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
Almidón de papa	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Agua (50% hielo + 50% agua fría)	30.50	30.00	30.00	30.20	28.30	30.20	30.20
Galimax DN47 P ^o		0.50 ^u					
Galimax AN50 P			0.50				
Galimax FV100 P				0.30			
Galimax DN4 L ^d					2.20		
Galimax DN47 P						0.3	
INBAC 10NA P							0.30

^o Polvo, ^d líquido. MDM: carne mecánicamente separada, por sus siglas en inglés.

Fuente: propuesta Galactic.

^u El porcentaje de conservante se resta de la cantidad de agua añadida. Tomando en cuenta este cambio se realiza la evaluación de efectos en la humedad y actividad de agua en el producto.

Cuadro 3. Resumen de la composición de los conservantes y dosis utilizadas.

Nombre comercial	Clasificación	Ingrediente activo	%	Dosis %	IA %	Composición final %
Galimax Diace N47	Conservante cárnico	Lactato de sodio	36.2	0.5	95.0	0.172
		Acetato de sodio	36.2			0.172
		Diacetato de sodio	24.4			0.116
Galimax Ace N-50	Conservante cárnico	Lactato de sodio	49	0.5	95.0	0.233
		Acetato de sodio	49			0.233
Galimax Flavor V-100	Conservante cárnico	Acetato de sodio natural	100	0.3	85.0	0.255
Galimax Diace N-4	Conservante cárnico	Lactato de sodio	56	2.2	60.0	0.739
		Diacetato de sodio	4			0.053
INBAC ^ψ 10NA	Conservante cárnico	Ácidos orgánicos y nisina	100	0.3	95.0	0.285

Fuente: Galactic.

^ψ Producto de otra empresa, a base de ácidos orgánicos y 2% de nisina. IA %: porcentaje de pureza del ingrediente activo. Dosis: es el porcentaje aplicado del producto comercial en la formulación final.

La carga mínima para trabajar en la cortadora silenciosa es de 6 kilogramos, por lo que la formulación anterior se ajustó a las necesidades de producción. Se utilizó el material suficiente para la elaboración de 10 salchichas de 50 cm de largo aproximadamente y el sobrante fue desechado. Después de cocidas las salchichas fueron cortadas en trozos de 25 g para la prueba desafío y 30 g para análisis fisicoquímico y microbiológico (incluye mesófilos aerobios y bacterias ácido lácticas).

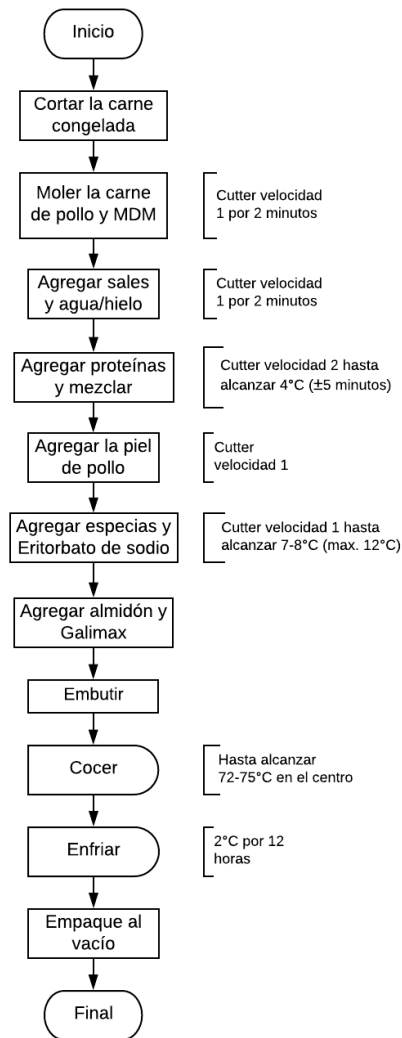


Figura 1. Flujo de proceso para la elaboración de las salchichas de pollo.

Fuente: Galactic (modificado).

MDM: carne mecánicamente deshuesada (por sus siglas en inglés, Mechanically Deboned Meat).

Descripción del flujo de proceso.

Se cortó la carne congelada (-20 °C) utilizando la sierra para obtener piezas de 9.68 cm³. Los trozos se empaquetaron en bolsas de 2.3 kg para facilitar la manipulación posterior y se colocaron nuevamente en el congelador. Se molió la carne de pollo y la carne

mecánicamente deshuesada (MDM, por sus siglas en inglés): en la cortadora silenciosa a velocidad 1 por dos minutos. Además, se añadieron las sales tanto sal normal (NaCl), sal de cura (nitritos) poli fosfatos y agua/hielo con la cortadora silenciosa en velocidad 1 por 2 minutos. Se añadió la proteína y se mezcló a velocidad 2 en la maquina hasta alcanzar 4 °C (±5 minutos). Se agregó la piel de pollo y se mezcló en velocidad 1. Seguidamente se añadieron las especias y el eritorbato de sodio, seguido del almidón y producto Galimax: mezclado hasta alcanzar 7-8 °C (max. 12 °C). Después el producto se sometió a un embutido firme que luego fue cocinado hasta alcanzar temperatura de 72-75 °C en el centro. Luego se aplicó una ducha con agua fría por cinco minutos y un enfriado a 2 °C por doce horas. Finalmente se empacó al vacío en el día uno, utilizando el programa para salchichas establecido en la empacadora.

Análisis fisicoquímico.

Las muestras por cuadruplicado fueron evaluadas para pH, humedad, actividad de agua y color. El pH se midió con un Meat pH meter modelo HI99163 marca HANNA, bajo la metodología descrita por Honikel (1998). Calibrando el equipo con buffer pH 4 y 7. Luego se tomó la muestra y se introdujo el electrodo para una lectura directa. Lavando el electrodo con la solución buffer cada 8 mediciones.

El color se midió con un equipo Chroma meter modelo CR-400 marca Minolta: los valores se registraron en la escala L*, a*, b*. Los cuales describen los colores de acuerdo a su posición en un eje de tres coordenadas, en tercera dimensión. L* es la claridad o luminosidad en una escala de 0 a 100, a* va verde (-60) a rojo (+60) y el eje de b* de azul (-60) a amarillo (+60) (Westland 2004).

Dadas las condiciones de evaluación se midió el cambio en intensidad de color (E) en la escala CIEL*a*b*. La ecuación utilizada para el cálculo fue la siguiente, siendo la ecuación 2 la ampliación de la ecuación 1:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2} \quad [1]$$

$$\Delta E = \sqrt{(L_1 - L_2)^2 + (a_1 - a_2)^2 + (b_1 - b_2)^2} \quad [2]$$

La humedad se midió utilizando una balanza térmica de infrarrojo a una temperatura de 130 °C y un tamaño de muestra de 3 ± 0.005 g. la actividad de agua (a_w) se evaluó utilizando el equipo Huurmeter LabSwift-aw modelo 1007001 marca Novasina. Se colocó la muestra de cada tratamiento en los recipientes respectivos, la cantidad suficiente hasta cubrir la mitad del contenedor y luego los mismos fueron puestos en la cámara hasta que el equipo generó una lectura estándar.

Análisis microbiológico.

Conteo de mesófilos. Se utilizaron placas 3M™ Petrifilm™ Aerobic Count Plates (APC, por sus siglas en inglés). Las cuales están autorizados por Official Methods of Analysis (OMA 2015) #986.33 y #989.10. Inicialmente se tomaron 10 g de muestra de salchicha y se agregaron 90 ml de agua peptonada, se colocó en el stomacher para homogenización por un minuto. Luego se realizaron las diluciones correspondientes (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), utilizando 1 ml de la muestra y 9 ml de agua peptona en tubos de ensayo estériles. Por último, se tomó 1 ml de la muestra de cada tubo de ensayo y se colocó en la placa Petrifilm para ser puesta a incubación por 24 horas a 30 °C.

Crecimiento de *Listeria*. El cultivo de *Listeria innocua* se preparó el día antes del empaquetado del producto, tomando un Culti-Loop de Thermo Scientific™ Culti-Loops™ *Listeria innocua* ATCC® 33090™ y disolviendo su contenido por medio de agitación en un frasco de 225 ml de agua peptona. Posteriormente se colocó en incubación por un periodo de 24 horas a 37 °C. Al día siguiente se midió la densidad óptica (OD) a una longitud de onda de 260 nm, colocando 200 µL de cultivo por celda (tres celdas) en un micro plato. Después de la lectura se promediaron los tres resultados y se aplicó la ecuación especial para ajuste a logaritmo:

$$\text{Log} = 1.849 (\text{OD}) + 7.6886 \quad [3]$$

Se realizó una dilución en agua peptona suficiente para alcanzar 4 Log UFC/g para la siembra. Finalmente se colocaron 25 g de salchicha en una bolsa y se agregó 1 ml de la preparación de *Listeria*, colocando las bolsas en el mismo ambiente de evaluación bajo refrigeración (6 °C).

Evaluación de bacterias ácido lácticas (BAL). Inicialmente, se preparó el medio MRS el cual fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe (Thermo Scientific 2018), proveyendo un medio que evidencia el crecimiento de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas. La preparación se hizo pesando el polvo (62 g/L) y colocándolo en agua destilada o desionizada; luego de mezclar, se dejó reposar por 5 minutos, se mezcló calentando a punto de ebullición hasta disolver todo el contenido. El medio fue esterilizado a 121 °C por 15 minutos. Con un pH final de 6.4 ± 0.2 . El medio se almacenó a 4 °C (óptimo 2-8 °C según indicaciones en el envase). Luego fue fundido y enfriado a 45 °C para la siembra.

Bajo la misma metodología de dilución para mesófilos aerobios, se tomaron 10 g de la muestra de salchicha, se agregaron 90 ml de agua peptona y luego se colocaron en el stomacher por 1 minuto. Se realizaron las diluciones correspondientes (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) para la siembra del cultivo, utilizando 1 ml de la muestra y 9 ml de agua peptona. Se utilizó la técnica de vertido en placa y doble capa de 15 y 5 ml del medio de cultivo para proveer condiciones anaerobias, luego las placas fueron colocadas en un tarro especial para cultivo de anaerobios adicionado con Anaerocult® A una mezcla de reactivos para producir un medio anaeróbico en el recipiente de anaerobios. Y se incubó a 37 °C por 3 días.

Anaerocult® A contiene componentes que fijan químicamente en forma completa el oxígeno dentro de corto tiempo y produce un medio exento de O₂ inclusive una atmosfera de CO₂. Para la evaluación del medio se utilizó una tira de Anaerotest® activada con 1 gota de agua y fijada al depósito de placas. El papel especial de Anaerocult® A se activó añadiendo 35 ml de agua uniformemente distribuida en un tiempo de 15-20 segundos y luego se introdujo en el recipiente de anaerobios con la página impresa dirigida hacia las placas, finalmente se cerró el recipiente de anaerobios.

Parámetros evaluados semanalmente. pH, actividad de agua (A_w), color, humedad, conteo de mesófilos aerobios, bacterias ácido lácticas y la prueba desafío para *Listeria*.

Modelos predictivos.

Para realizar la comparación entre los modelos predictivos de crecimiento sobre la especie *Listeria innocua* es necesario ingresar los parámetros específicos definidos en el Cuadro 4. El modelo Galactic está diseñado para utilizar directamente el nombre comercial del producto, mientras el modelo FSSP necesita la transformación de los productos a su composición en ingrediente activo.

Cuadro 4. Resumen de los datos de entrada para comparación de los modelos predictivos.

FSSP		Galactic	
Nivel inicial de <i>Listeria</i> (UFC/g)	1000.00	Humedad %	61.00
Temperatura (°C)	7.00	NaCl %	1.82
NaCl en solución %	2.90	Nombre del producto	Salchicha
pH	6.77	Tipo de alimento	Carne curada
Componentes de humo fenol (ppm)	0.00	Concentración inicial del patógeno <i>Listeria</i> (log UFC/g)	3.00
% CO ₂ en atmósfera en equilibrio	0.00	Tiempo (días)	30.00
Nitritos mg/kg	120.00	Temperatura (°C)	7.00
Periodo en almacenamiento (días)	30.00	pH	6.77
Ácido acético (ppm)	2111.00	Actividad de agua	0.97
Ácido benzoico (ppm)	0.00	Nitritos (mg/kg)	120.00
Ácido cítrico (ppm)	0.00	Concentración tolerable del patógeno (Log UFC/g)	5.00
Diacetato (ppm)	1905.00	Producto de Galactic	Galimax DN-47
Ácido láctico (ppm)	2261.00	Concentración del producto de Galactic % (p/p)	0.50
Ácido sórbico (ppm)	0.00		

Diseño experimental y análisis estadístico.

El diseño experimental utilizado fue un DCA (Diseño Completamente al Azar) con medidas repetidas en el tiempo al día 0, 7, 14, 21, 28 para análisis fisicoquímicos y microbiológicos. Se establecieron un total de siete tratamientos incluyendo el control con cuatro repeticiones.

Los tratamientos finales fueron siete incluyendo el control sin conservantes con cuatro repeticiones, para un total de 28 unidades experimentales. Las muestras analizadas fueron destruidas semanalmente para la evaluación del comportamiento durante el tiempo por lo que las 28 unidades experimentales se repitieron por 5 semanas resultando en un total de 140 muestras.

Los datos fueron analizados a través de un ANDEVA y se realizó una separación de medias por cuadrados mínimos (LSMeans por sus siglas en inglés) para evaluar el efecto de los tratamientos y el tiempo con una probabilidad de 5% ($\alpha=0.05$) en todos los análisis estadísticos utilizando el programa SAS versión 9.4 “Statistical Analysis System”.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de las variables fisicoquímicas en salchichas de pollo.

La humedad, actividad de agua, pH y color fueron analizados a los días 0, 7, 14, 21 y 28 durante el almacenamiento a 6 °C. Existiendo diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) en las interacciones del tratamiento y los días en almacenamiento.

Los resultados obtenidos sobre la evaluación del pH muestran que los tratamientos AN50 y V100 son estadísticamente iguales al control aun cuando la concentración del V100 es de 0.3% y AN50 de 0.5%, el control presenta una media de pH 6.78 ± 0.02 . Lo anterior, podría estar relacionado a la concentración del ingrediente activo en los compuestos y en el caso de V100 utilizado a una dosis menor a todos los demás tratamientos, pero con una concentración al 85% del ingrediente activo acetato de sodio sin purificar. Siendo únicamente igual a INBAC 10 NA; que contiene nisina en su composición.

Uno de los principales problemas de la industria alimentaria al utilizar ácidos como antimicrobianos es la disminución del pH que estos causan. Al disminuir el pH generan una sensación de acidez en los productos. Acidez que el consumidor asocia a procesos de deterioro. En algunos países siguen usándose conservantes como las sales de ácido sórbico o benzoico (Ayala *et al.* 2007). En el caso del sorbato de potasio es poco efectivo a pH normales de embutidos cocidos, pero es muy buen inhibidor de mohos teniendo una baja efectividad contra levaduras y bacterias.

Actualmente, se ha promovido el uso de otro tipo de conservantes más naturales a base de la fermentación láctica de azúcares, ejemplo de ellos los lactatos, acetatos y diacetatos. Estos tienen la capacidad de reducir la actividad de agua del producto por medio de la ligación de la misma (Gómez *et al.* 2013). Además, actúan como antimicrobianos contra algunos patógenos, principalmente *Escherichia coli*, *Clostridium botulinum* y *Listeria monocytogenes* (Freixanet 2010).

El pH es un factor determinante de la capacidad de retención de agua (CRA) en los embutidos tomando en cuenta que el pH isoelectrico de las proteínas está en torno a 5.5; donde las condiciones de repulsión entre proteínas son mínimas, tienden a aproximarse entre sí y expulsan agua (Vidal 1997). Por ello, en las salchichas de pollo cocidas se requiere que el pH esté alejado de este punto para permitir una CRA mayor y con ello evitar purgas en almacenamiento de producto.

Al evaluar el efecto de los conservantes sobre los cambios en el pH de las salchichas (Cuadro 5) se observó que el tratamiento con mayores cambios durante el tiempo en el pH fue AN50 (0.5%) pero manteniéndose por debajo de un pH de 7 durante los 28 días de evaluación. Los cambios fueron significativos ($P < 0.05$) observándose variaciones en la interacción tratamiento y día por lo que se evaluó por separado.

De manera general, el pH de todos los tratamientos tuvo una tendencia a disminuir, concordando con resultados encontrados por Cabeza (2011) quién concluyó que el lactato de sodio y el aumento en días de almacenamiento disminuyen los valores del pH. Esto representa un resultado favorable en cuanto a problemas de contaminación bacteriana, dado que a pH entre 6.0-6.4 se tiene una actividad mayor de los microorganismos, mientras que a pH más bajos esta actividad disminuye (FSIS 2004; 2014; 2016).

Cuadro 5. Cambios de pH en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días en refrigeración a 6 °C.

TRT	Días de evaluación				
	0	7	14	21	28
Control	6.78 ± 0.02 ^a	6.55 ± 0.06 ^{bcd}	6.74 ± 0.01 ^b	6.58 ± 0.03 ^a	6.66 ± 0.04 ^b
DN47 ¹	6.60 ± 0.05 ^b	6.38 ± 0.13 ^d	6.61 ± 0.02 ^{de}	6.36 ± 0.05 ^d	6.66 ± 0.04 ^b
AN50	6.75 ± 0.01 ^a	6.89 ± 0.06 ^a	6.81 ± 0.02 ^a	6.57 ± 0.04 ^{ab}	6.76 ± 0.02 ^a
V100	6.74 ± 0.01 ^a	6.67 ± 0.04 ^b	6.70 ± 0.02 ^{bc}	6.61 ± 0.01 ^a	6.69 ± 0.05 ^{ab}
DN4	6.64 ± 0.01 ^b	6.58 ± 0.04 ^{bc}	6.63 ± 0.01 ^{cde}	6.50 ± 0.02 ^{bc}	6.63 ± 0.02 ^b
DN47 ²	6.65 ± 0.01 ^b	6.45 ± 0.02 ^{cd}	6.64 ± 0.01 ^{cd}	6.48 ± 0.01 ^c	6.63 ± 0.02 ^b
INBAC	6.65 ± 0.02 ^b	6.45 ± 0.16 ^{cd}	6.56 ± 0.07 ^e	6.44 ± 0.01 ^c	6.49 ± 0.03 ^c
CV (%)	0.29	1.26	0.44	0.49	0.49

TRT: tratamiento, CV: coeficiente de variación.

¹ Concentración usada 0.5%. ² Concentración usada 0.3%. DN47: lactato de sodio, acetato de sodio y diacetato de sodio. N50: lactato de sodio y acetato de sodio. V100: acetato de sodio natural. DN4: lactato de sodio y diacetato de sodio. INBAC: producto de la marca Peisa® con un contenido de 2% de nisina en la formulación.

^{a-e} Medias con letra minúscula diferente en la misma columna representan diferencia estadística entre tratamientos en el mismo día ($P < 0.05$).

En el Cuadro 6 se observan los resultados en porcentaje de agua en la muestra. Existiendo diferencias no significativas ($P > 0.05$) entre tratamientos al día 0; mientras que existen diferencias del día 7 al 28. El producto V100 (0.3%) es el que presenta la menor humedad seguido por INBAC (0.3%). Los porcentajes de conservante utilizado en los dos tratamientos que mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) fueron utilizados a un 0.3%, mientras los demás tratamientos se utilizaron a una dosis de 0.5% y DN4 (2.2%). Lo anterior, concuerda con Gabas *et al.* (2009) quienes al utilizar diferentes concentraciones de aditivos en polvo encontraron que la humedad se ve afectada.

Cuadro 6. Cambios de humedad en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días en refrigeración a 6 °C.

TRT	Días de evaluación				
	0	7	14	21	28
Control	62.53 ± 0.71 ^a	62.63 ± 0.51 ^{bc}	63.63 ± 0.54 ^a	62.63 ± 0.64 ^{ab}	62.83 ± 0.74 ^a
DN47 ¹	61.30 ± 0.85 ^a	61.85 ± 0.39 ^c	61.98 ± 0.46 ^{bc}	60.95 ± 0.43 ^{cd}	61.73 ± 0.17 ^{bc}
AN50	61.95 ± 0.73 ^a	61.98 ± 0.79 ^{bc}	61.78 ± 0.28 ^{bc}	60.68 ± 1.36 ^d	61.35 ± 0.26 ^c
V100	61.95 ± 1.11 ^a	60.70 ± 0.43 ^d	61.30 ± 0.58 ^c	61.80 ± 0.37 ^{bcd}	62.58 ± 0.37 ^a
DN4	62.88 ± 0.41 ^a	62.70 ± 0.29 ^{bc}	62.48 ± 0.50 ^b	62.88 ± 0.26 ^{ab}	62.60 ± 0.26 ^a
DN47 ²	61.38 ± 1.41 ^a	63.03 ± 0.15 ^{ab}	62.68 ± 0.22 ^b	61.98 ± 0.38 ^{abc}	62.23 ± 0.15 ^{ab}
INBAC	62.90 ± 0.88 ^a	64.05 ± 0.26 ^a	64.25 ± 0.24 ^a	63.14 ± 0.21 ^a	62.93 ± 0.36 ^a
CV (%)	1.52	0.76	0.63	0.85	0.58

TRT: tratamiento, CV: coeficiente de variación.

¹ Concentración usada 0.5%. ² Concentración usada 0.3%. DN47: lactato de sodio, acetato de sodio y diacetato de sodio. N50: lactato de sodio y acetato de sodio. V100: acetato de sodio natural. DN4: lactato de sodio y diacetato de sodio. INBAC: producto de la marca Peisa® con un contenido de 2% de nisina en la formulación.

^{a-d} Medias con letra minúscula diferente en la misma columna representan diferencia estadística entre tratamientos en el mismo día ($P < 0.05$).

En el Cuadro 7 se describen las diferencias en actividad de agua entre tratamientos para los diferentes días evaluados. Este parámetro no presentó diferencias ($P > 0.05$) durante el periodo de evaluación para cada tratamiento, concordando con los resultados de Santos *et al.* (2010), quien menciona que el efecto antimicrobiano de los lactatos se atribuye a la habilidad para reducir la actividad de agua que pueden utilizarse en concentraciones de hasta 4.8% mientras que los acetatos y diacetatos en un 0.25% del peso del producto. En este caso, el efecto puede ser menos marcado por el uso de una mezcla de compuestos.

Cuadro 7. Actividad de agua en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.

TRT	Días de evaluación				
	0	7	14	21	28
Control	0.942 ± 0.002 ^a	0.942 ± 0.004 ^{ab}	0.943 ± 0.002 ^b	0.943 ± 0.004 ^a	0.943 ± 0.002 ^b
DN47 ¹	0.941 ± 0.002 ^a	0.939 ± 0.002 ^b	0.940 ± 0.001 ^b	0.941 ± 0.002 ^a	0.940 ± 0.001 ^b
AN50	0.941 ± 0.001 ^a	0.939 ± 0.001 ^b	0.940 ± 0.001 ^b	0.940 ± 0.001 ^a	0.939 ± 0.001 ^b
V100	0.942 ± 0.002 ^a	0.939 ± 0.001 ^b	0.940 ± 0.001 ^b	0.939 ± 0.001 ^a	0.938 ± 0.003 ^b
DN4	0.940 ± 0.006 ^a	0.943 ± 0.001 ^b	0.941 ± 0.001 ^b	0.943 ± 0.002 ^a	0.941 ± 0.001 ^b
DN47 ²	0.940 ± 0.001 ^a	0.944 ± 0.002 ^b	0.943 ± 0.002 ^b	0.944 ± 0.001 ^a	0.944 ± 0.002 ^{ab}
INBAC	0.940 ± 0.005 ^a	0.940 ± 0.002 ^a	0.947 ± 0.003 ^a	0.946 ± 0.003 ^a	0.946 ± 0.001 ^a
CV (%)	0.44	0.32	0.29	0.45	0.32

TRT: tratamiento, CV: coeficiente de variación.

¹ Concentración usada 0.5%. ² Concentración usada 0.3%. DN47: lactato de sodio, acetato de sodio y diacetato de sodio. N50: lactato de sodio y acetato de sodio. V100: acetato de sodio natural. DN4: lactato de sodio y diacetato de sodio. INBAC: producto de la marca Peisa® con un contenido de 2% de nisina en la formulación.

^{a-b} Medias con letra minúscula diferente en la misma columna representan diferencia estadística entre tratamientos en el mismo día (P < 0.05).

Uno de los aspectos sensoriales más importantes en los productos de consumo humano es el color (García *et al.* 2011), tanto por el atractivo visual como la correlación que hacen las personas con otros parámetros de calidad “El color es un índice de calidad en la industria alimentaria” asegura Arboleda (2008). El valor L^* determina la luminosidad o claridad de la muestra analizada, en el Cuadro 8 se muestran los resultados para cambios en la variable L^* . El valor de a^* , relacionado a las tonalidades de rojo como se muestra en el Cuadro 9 y se caracteriza por una disminución del valor durante el tiempo al igual que la variable b^* es la gradiente del color anaranjado que se observa en el Cuadro 10. Resultados similares fueron descritos por Gómez *et al.* (2013) en el estudio denominado “Efecto de antimicrobianos naturales sobre la estabilidad fisicoquímica, microbiológica y sensorial de hamburguesas de res mantenidas en refrigeración”. En donde la reducción del color rojo de la carne de res molida, adicionada de lactato de potasio, metasilicato de sodio, ácido peracético y cloruro de sodio acidificado, fue observada durante los siete días de almacenamiento en refrigeración a 4 °C.

En relación al efecto de los antimicrobianos sobre las características de color de las salchichas de pollo, se comprobó que los tratamientos mostraron una tendencia similar en el comportamiento de la variable durante el tiempo, siendo el tratamiento DN47 (0.5%) el que presento una mayor constancia y mayores valores de L^* ($P < 0.05$) variable de luminosidad en comparación con los demás tratamientos a lo largo del almacenamiento. La luminosidad o claridad del producto es un efecto deseado en el caso de cárnicos (García *et al.* 2011), puede relacionarse como indicador de frescura o calidad. Mientras que valores bajos visualmente son percibidos como cambios indeseables (oscuros) en el producto, los cuales el consumidor puede relacionar con deterioro del alimento.

No se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) en los valores de $L^*a^*b^*$ a través del tiempo para ninguno de los tratamientos aplicados, sin embargo, existe una diferencia marcada al comparar los valores de diferencia de intensidad del color tomando como referencia el control. Esta característica fue significativa ($P < 0.05$) únicamente del día 0 al 21, ya que en el día 28 no existe diferencia en el cambio de la variable E (Cuadro 11) para ninguno de los tratamientos. V100 (0.3%) se mantuvo estadísticamente en un valor igual durante todo el tiempo de evaluación. En el caso del cambio en intensidad de color que incluye las variables L^* , a^* y b^* se requiere que la variación sea mínima respecto al control para que el consumidor no perciba cambios significativos en el producto por la adición de los distintos tratamientos, por lo tanto, el tratamiento que cumple con estos requerimientos es V100 (0.3%).

Cuadro 8. Cambios en la variable L de color en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.

TRT	Días de evaluación				
	0	7	14	21	28
Control	65.52 ± 0.37 ^{aY}	66.48 ± 0.33 ^{aY}	66.06 ± 0.39 ^{abY}	66.12 ± 0.46 ^{aY}	65.34 ± 2.12 ^{aY}
DN47 ¹	63.65 ± 0.28 ^{aY}	65.12 ± 0.44 ^{bcY}	64.75 ± 0.14 ^{bY}	64.26 ± 1.35 ^{bY}	64.87 ± 0.43 ^{aY}
AN50	60.71 ± 1.06 ^{bZ}	63.00 ± 0.34 ^{dY}	61.15 ± 1.24 ^{dZ}	61.86 ± 0.42 ^{cZ}	61.99 ± 0.51 ^{bZ}
V100	59.99 ± 1.14 ^{bZ}	61.10 ± 0.75 ^{eZ}	61.31 ± 0.51 ^{dZ}	61.15 ± 0.54 ^{cZ}	62.34 ± 0.25 ^{bY}
DN4	63.74 ± 0.60 ^{aY}	64.71 ± 0.25 ^{cY}	63.36 ± 1.04 ^{cY}	63.89 ± 0.59 ^{bY}	64.07 ± 0.47 ^{abY}
DN47 ²	63.89 ± 0.60 ^{aZ}	66.13 ± 0.52 ^{abY}	65.74 ± 0.32 ^{bY}	65.40 ± 0.57 ^{aY}	66.32 ± 0.46 ^{aY}
INBAC	65.31 ± 1.51 ^{aZ}	66.79 ± 0.32 ^{aY}	67.20 ± 0.26 ^{aY}	66.73 ± 0.24 ^{aY}	65.97 ± 0.79 ^{aY}
CV (%)	1.42	0.72	0.89	1.02	1.52

TRT: tratamiento, CV: coeficiente de variación.

¹ Concentración usada 0.5%. ² Concentración usada 0.3%. DN47: lactato de sodio, acetato de sodio y diacetato de sodio. N50: lactato de sodio y acetato de sodio. V100: acetato de sodio natural. DN4: lactato de sodio y diacetato de sodio. INBAC: producto de la marca Peisa® con un contenido de 2% de nisina en la formulación.

^{a-e} Medias con letra minúscula diferente en la misma columna representan diferencia estadística entre tratamientos en el mismo día (P < 0.05).

^{Y-Z} Medias con letra mayúscula diferente en la misma línea representan diferencia estadística entre los días de evaluación (P < 0.05).

Cuadro 9. Cambios en la variable a* de color en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.

TRT	Días de evaluación				
	0	7	14	21	28
Control	7.15 ± 0.34 ^{bV}	6.12 ± 0.21 ^{bW}	3.93 ± 0.13 ^{cX}	2.62 ± 0.12 ^{bY}	2.16 ± 0.26 ^{bY}
DN47 ¹	8.04 ± 0.15 ^{aV}	7.00 ± 0.19 ^{aW}	4.83 ± 0.06 ^{aX}	3.73 ± 0.65 ^{aY}	3.28 ± 0.06 ^{aY}
AN50	7.18 ± 0.26 ^{abV}	6.62 ± 0.02 ^{abW}	4.08 ± 0.19 ^{cX}	2.83 ± 0.21 ^{bZ}	3.19 ± 0.17 ^{aY}
V100	7.80 ± 0.14 ^{abV}	6.38 ± 0.22 ^{bW}	4.85 ± 0.23 ^{aX}	3.18 ± 0.17 ^{abY}	3.15 ± 0.30 ^{aY}
DN4	7.39 ± 0.25 ^{abV}	6.45 ± 0.41 ^{abW}	4.44 ± 0.19 ^{bX}	3.23 ± 0.13 ^{abY}	3.23 ± 0.21 ^{aY}
DN47 ²	7.52 ± 0.23 ^{abV}	6.04 ± 0.05 ^{bW}	4.16 ± 0.05 ^{bcX}	3.01 ± 0.01 ^{bY}	2.87 ± 0.12 ^{aY}
INBAC	7.81 ± 0.80 ^{abV}	5.41 ± 0.42 ^{cW}	3.91 ± 0.05 ^{cX}	2.72 ± 0.13 ^{bY}	2.88 ± 0.16 ^{aY}
CV (%)	4.91	4.02	3.17	8.93	7.00

TRT: tratamiento, CV: coeficiente de variación.

¹ Concentración usada 0.5%. ² Concentración usada 0.3%. DN47: lactato de sodio, acetato de sodio y diacetato de sodio. N50: lactato de sodio y acetato de sodio. V100: acetato de sodio natural. DN4: lactato de sodio y diacetato de sodio. INBAC: producto de la marca Peisa® con un contenido de 2% de nisina en la formulación.

^{a-c} Medias con letra minúscula diferente en la misma columna representan diferencia estadística entre tratamientos en el mismo día (P < 0.05).

^{V-Z} Medias con letra mayúscula diferente en la misma línea representan diferencia estadística entre los días de evaluación (P < 0.05).

Cuadro 10. Cambios en la variable b* de color en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.

TRT	Días de evaluación				
	0	7	14	21	28
Control	21.03 ± 0.39 ^{abVW}	21.72 ± 0.09 ^{aV}	21.30 ± 0.24 ^{bVW}	21.36 ± 0.22 ^{cVW}	20.65 ± 0.68 ^{cW}
DN47 ¹	20.94 ± 0.28 ^{abW}	20.93 ± 0.38 ^{aW}	22.31 ± 0.06 ^{aV}	21.75 ± 0.75 ^{cVW}	21.68 ± 0.29 ^{bVW}
AN50	20.17 ± 0.11 ^{bX}	21.44 ± 0.11 ^{aVW}	21.26 ± 0.38 ^{bW}	21.73 ± 0.60 ^{cVW}	22.06 ± 0.23 ^{bV}
V100	20.60 ± 0.30 ^{bW}	22.00 ± 0.49 ^{aV}	22.35 ± 0.71 ^{aV}	22.06 ± 0.06 ^{abV}	22.09 ± 0.19 ^{abV}
DN4	20.25 ± 0.67 ^{bW}	21.76 ± 0.70 ^{aV}	22.14 ± 0.34 ^{aV}	22.82 ± 0.16 ^{abV}	22.19 ± 0.31 ^{abV}
DN47 ²	21.36 ± 0.46 ^{abW}	20.99 ± 0.87 ^{aW}	22.14 ± 0.31 ^{aVW}	23.11 ± 0.36 ^{aV}	21.62 ± 0.12 ^{cW}
INBAC	22.05 ± 0.90 ^{aVWX}	21.45 ± 0.38 ^{aWX}	21.26 ± 0.10 ^{bX}	22.31 ± 0.18 ^{bcVW}	22.94 ± 0.42 ^{aV}
CV (%)	2.56	2.45	1.56	1.87	1.71

TRT: tratamiento, CV: coeficiente de variación.

¹ Concentración usada 0.5%. ² Concentración usada 0.3%. DN47: lactato de sodio, acetato de sodio y diacetato de sodio. N50: lactato de sodio y acetato de sodio. V100: acetato de sodio natural. DN4: lactato de sodio y diacetato de sodio. INBAC: producto de la marca Peisa® con un contenido de 2% de nisina en la formulación.

^{a-e} Medias con letra minúscula diferente en la misma columna representan diferencia estadística entre tratamientos en el mismo día (P < 0.05).

^{V-Z} Medias con letra mayúscula diferente en la misma línea representan diferencia estadística entre los días de evaluación (P < 0.05).

Cuadro 11. Cambios en la variable de intensidad de color (E) en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.

TRT	Días de evaluación				
	0	7	14	21	28
Control	2.09 ± 0.30 ^{bY}	0.61 ± 0.39 ^{dZ}	2.76 ± 0.06 ^{bX}	3.99 ± 0.13 ^{cW}	4.00 ± 0.12 ^{dW}
DN47 ¹	4.90 ± 1.03 ^{aW}	2.61 ± 0.34 ^{bX}	5.38 ± 1.09 ^{aW}	5.74 ± 0.33 ^{aW}	5.42 ± 0.41 ^{aW}
AN50	5.60 ± 1.12 ^{aW}	4.61 ± 0.78 ^{aW}	5.02 ± 0.55 ^{aW}	6.00 ± 0.37 ^{aW}	5.22 ± 0.64 ^{abW}
V100	2.05 ± 0.64 ^{bX}	1.45 ± 0.38 ^{cdX}	3.71 ± 0.72 ^{bW}	4.64 ± 0.12 ^{bW}	4.36 ± 0.19 ^{cdW}
DN4	1.77 ± 0.57 ^{bY}	1.53 ± 0.19 ^{cY}	3.21 ± 0.17 ^{bX}	4.67 ± 0.15 ^{bW}	4.41 ± 0.01 ^{cdW}
DN47 ²	2.60 ± 1.42 ^{bX}	2.26 ± 0.27 ^{bcX}	3.66 ± 0.08 ^{bX}	4.77 ± 0.16 ^{bW}	4.76 ± 0.10 ^{bcW}
CV (%)	29.73	17.97	12.26	4.4	5.14

TRT: tratamiento, CV: coeficiente de variación.

¹ Concentración usada 0.5%. ² Concentración usada 0.3%. DN47: lactato de sodio, acetato de sodio y diacetato de sodio. N50: lactato de sodio y acetato de sodio. V100: acetato de sodio natural. DN4: lactato de sodio y diacetato de sodio. INBAC: producto de la marca Peisa® con un contenido de 2% de nisina en la formulación.

^{a-d} Medias con letra minúscula diferente en la misma columna representan diferencia estadística entre tratamientos en el mismo día ($P < 0.05$).

^{w-z} Medias con letra mayúscula diferente en la misma línea representan diferencia estadística entre los días de evaluación ($P < 0.05$).

En el Cuadro 12 se observan los efectos de los tratamientos sobre el crecimiento de mesófilos aerobios. Al día cero las variaciones entre tratamientos se deben al error experimental, en dónde al momento de la elaboración de las salchichas el control sobre la manipulación de equipos e ingredientes generó que el conteo inicial fuera distinto; por ello también se evalúa su efecto incremental en el tiempo. Encontrando diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) para los tratamientos en la misma línea (días de evaluación), tomando en cuenta que los mayores valores en logaritmo de UFC/g se observan al día 28 por el incremento durante almacenamiento ($6\text{ }^{\circ}\text{C}$). Mientras que, los tratamientos que presentan los mejores resultados de comportamiento durante el tiempo, es decir bajo nivel de conteo microbiano son principalmente AN50 (0.5%), DN47 (0.5%) y V100 (0.3%) durante los primeros 21 días. Sin embargo, en el día 28 no existe diferencia estadística ($P > 0.05$) entre tratamientos sobre el control bacteriano. Manteniéndose aun así los tratamientos de V100 (0.3%) DN4 (2.2%) e INBAC 10NA bajo el límite permitido en el RTCA (2017) de 6 Log UFC/g para carnes cocidas.

El conteo de mesófilos aerobios es influenciado por la carga inicial después del procesamiento, y está relacionado a evaluaciones de calidad, predicción de la vida útil, verificación de la limpieza y desinfección correctas, si se respetaron las temperaturas y tiempos a los que fueron sometidos los alimentos, fallas en el mantenimiento y temperatura, además de una contaminación post elaboración (ANMAT 2011). Al aplicar la combinación de lactato, acetato y diacetato en los tratamientos a las salchichas se observó que los mejores resultados expresados en Log UFC/g los presentaron los tratamientos AN50 (0.5%), V100 (0.3%) y DN4 (2.2%). Importante mencionar que, de estos, V100 se trabajó a la menor concentración agregada a la formulación, denotando un resultado favorable en inhibición del crecimiento microbiano.

Cuadro 12. Conteo en logaritmos de mesófilos aerobios en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días en refrigeración (6 °C).

TRT	Días de evaluación				
	0	7	14	21	28
Control	2.16 ± 0.15 ^{aZ}	3.35 ± 0.04 ^{aY}	4.31 ± 0.05 ^{aX}	5.40 ± 0.06 ^{aW}	6.63 ± 0.07 ^{aV}
DN47 ¹	1.76 ± 0.22 ^{bY}	1.73 ± 0.19 ^{bY}	2.03 ± 0.07 ^{cX}	4.32 ± 0.05 ^{bW}	5.13 ± 0.02 ^{bV}
AN50	1.12 ± 0.24 ^{cZ}	1.79 ± 0.26 ^{bY}	2.10 ± 0.05 ^{cX}	4.21 ± 0.04 ^{cW}	5.46 ± 0.02 ^{bV}
V100	1.39 ± 0.27 ^{cX}	1.19 ± 0.24 ^{cX}	2.10 ± 0.19 ^{cW}	4.52 ± 0.04 ^{bV}	4.64 ± 0.01 ^{cV}
DN4	1.55 ± 0.42 ^{bcX}	1.15 ± 0.17 ^{cY}	1.39 ± 0.27 ^{dX}	2.45 ± 0.02 ^{dW}	4.61 ± 0.01 ^{cV}
DN47 ²	2.37 ± 0.07 ^{aY}	1.86 ± 0.07 ^{bZ}	3.25 ± 0.03 ^{bX}	4.21 ± 0.04 ^{bW}	5.34 ± 0.02 ^{bV}
INBAC	2.30 ± 0.06 ^{aW}	1.96 ± 0.13 ^{bX}	2.07 ± 0.08 ^{cX}	3.05 ± 0.04 ^{cV}	3.05 ± 0.02 ^{dV}
CV (%)	12.21	8.34	5.67	1.13	0.65

TRT: tratamiento, CV: coeficiente de variación.

¹ Concentración usada 0.5%. ² Concentración usada 0.3%. DN47: lactato de sodio, acetato de sodio y diacetato de sodio. N50: lactato de sodio y acetato de sodio. V100: acetato de sodio natural. DN4: lactato de sodio y diacetato de sodio. INBAC: producto de la marca Peisa® con un contenido de 2% de nisina en la formulación.

^{a-c} Medias con letra minúscula diferente en la misma columna representan diferencia estadística entre tratamientos en el mismo día (P < 0.05).

^{v-z} Medias con letra mayúscula diferente en la misma línea representan diferencia estadística entre los días de evaluación (P < 0.05).

En el Cuadro 13 se presenta el ordenamiento de medias para el crecimiento de bacterias ácido lácticas en las salchichas, manteniendo un comportamiento similar del crecimiento bacteriano entre tratamientos durante el periodo de almacenamiento a 6 °C. Mientras que, en la evaluación por día, existe una marcada diferencia entre INBAC 10NA y el resto de tratamientos, siendo este el que mantiene la misma concentración inicial hasta finalizados los 28 días. De acuerdo a Lozano *et al.* (2009), una concentración de INBAC 10NA de 0.3% permite el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* mientras que al aumentar la dosis hasta 0.6 % existe un efecto inhibitorio del crecimiento. Los resultados podrían diferir debido a que este autor realizó su experimento utilizando la metodología de Bioscreen para obtener las gráficas de crecimiento durante 24 horas.

Las bacterias ácido lácticas son uno de los principales microorganismos que participan en procesos de alteración de las características sensoriales de los alimentos (Ossa *et al.* 2010). En este caso, al evaluar los distintos conservantes en las salchichas de pollo se observó que el mejor tratamiento ($P < 0.05$) fue INBAC 10NA, manteniendo la concentración inicial durante los 28 días en los cuales se midió el crecimiento bacteriano. Tomando en cuenta que de los tratamientos bajo estudio es el único que posee nisina (0.2% de la formulación) y que la nisina ha sido estudiada en conservación de carne cruda. Grande *et al.* (2011) encontraron efectos positivos principalmente sobre poblaciones de bacterias ácido lácticas, con el inconveniente de solubilidad a pH próximo a la neutralidad, interacción con los fosfolípidos y la inactivación por el glutatión.

Cuadro 13. Conteo en logaritmos de bacterias ácido láctico en salchichas adicionadas con diferentes conservantes y almacenadas en refrigeración a 6 ° C.

TRT	Días de evaluación				
	0	7	14	21	28
Control	1.27 ± 0.32 ^{aZ}	2.74 ± 0.22 ^{aY}	3.81 ± 0.05 ^{aX}	4.85 ± 0.03 ^{aW}	5.71 ± 0.03 ^{aV}
DN47 ¹	0.70 [^] ± 00 ^{bX}	2.62 ± 0.19 ^{aW}	3.12 ± 0.02 ^{cV}	3.23 ± 0.08 ^{cV}	3.47 ± 0.03 ^{cU}
AN50	0.70 ± 00 ^{bY}	2.56 ± 0.04 ^{aX}	2.79 ± 0.18 ^{dW}	2.94 ± 0.05 ^{dV}	3.05 ± 0.03 ^{dV}
V100	0.70 ± 00 ^{bY}	2.42 ± 0.05 ^{aX}	2.87 ± 0.03 ^{dW}	3.29 ± 0.06 ^{cV}	3.38 ± 0.12 ^{cV}
DN4	0.70 ± 00 ^{bY}	2.63 ± 0.19 ^{aW}	2.28 ± 0.09 ^{eX}	2.26 ± 0.04 ^{eW}	3.16 ± 0.02 ^{dV}
DN47 ²	0.70 ± 00 ^{bY}	1.96 ± 0.24 ^{bX}	3.42 ± 0.16 ^{bW}	4.31 ± 0.02 ^{bV}	4.41 ± 0.05 ^{bV}
INBAC	0.70 ± 00 ^{bU}	0.70 ± 00 ^{cU}	0.70 ± 00 ^{fU}	0.70 ± 00 ^{fU}	0.70 ± 00 ^{eU}
CV (%)	11.98	6.96	3.65	1.4	1.64

TRT: tratamiento, CV: coeficiente de variación.

¹ Concentración usada 0.5%. ² Concentración usada 0.3%. DN47: lactato de sodio, acetato de sodio y diacetato de sodio. N50: lactato de sodio y acetato de sodio. V100: acetato de sodio natural. DN4: lactato de sodio y diacetato de sodio. INBAC: producto de la marca Peisa® con un contenido de 2% de nisina en la formulación.

^{a-c} Medias con letra minúscula diferente en la misma columna representan diferencia estadística entre tratamientos en el mismo día (P < 0.05).

^{U-Z} Medias con letra mayúscula diferente en la misma línea representan diferencia estadística entre los días de evaluación (P < 0.05).

[^] Valores con media de 0.70 Log UFC/g y desviación estándar de 0 son estimados de la concentración de bacterias cuando el conteo en placa fue <10 UFC/g reportadas para fines de análisis en SAS 9.4 como un valor intermedio de 5 UFC/g.

Al evaluar el crecimiento de *Listeria innocua* (cepa no patogénica) mediante la prueba desafío o “Challenge test” se obtuvieron los resultados que se muestran en el Cuadro 14 y 15 (con una inoculación inicial de 3 y 1 Log UFC/g respectivamente). Se observa un comportamiento similar de crecimiento bacteriano para cada tratamiento durante los 28 días de evaluación, mientras que el ordenamiento de medias por día denota igualdad ($P > 0.05$) entre la concentración bacteriana al día 0, siendo este dato representativo si se toma en cuenta que al día cero todas las muestras se inocularon a la misma concentración.

El crecimiento bacteriano fue estadísticamente mayor para el control, a excepción del día 7 en el cual presentó uno de los valores más bajos. Además, los tratamientos INBAC 10NA y DN4 (2.2%) se ubicaron en segundo lugar, debajo del control. En el caso de INBAC 10NA su baja efectividad en cuanto a reducción de la tasa de crecimiento bacteriano se puede atribuir a la dosis utilizada (0.3%), tomando en cuenta que Lozano *et al.* (2009) recomienda el uso de una concentración correspondiente al doble de la utilizada en este estudio (0.6%) de INBAC 10NA para obtener un efecto inhibitorio de *Leuconostoc mesenteroides* (bacteria ácido láctica). Sin embargo, no menciona efectos sobre *Listeria*.

Martínez *et al.* (2011), establecen en el informe del comité científico de la agencia española de seguridad alimentaria y nutrición (AESAN), en relación a los estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en determinados productos alimenticios en el Reglamento de la Conformidad Europea (CE) N° 2073/2005 (2005), relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, en alimentos listos para el consumo (LPC/RTE) que pueden favorecer el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, el límite para este microorganismo es de ausencia en 25 g al igual que en el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 2012). Únicamente se establece un límite de 100 UFC/g en alimentos LPC no destinados a lactantes o a usos médicos especiales si el fabricante puede demostrar, a satisfacción de la autoridad competente que no se superará este límite durante la vida útil del producto.

Cuadro 14. Conteo en logaritmos de *Listeria innocua* bajo prueba desafío con inoculación inicial de 3 Log UFC/g.

TRT	Días de evaluación				
	0	7	14	21	28
Control	2.62 ± 0.11 ^{aZ}	3.37 ± 0.08 ^{fY}	6.76 ± 0.01 ^{aX}	7.98 ± 0.06 ^{aW}	8.96 ± 0.01 ^{aV}
DN47 ¹	2.74 ± 0.07 ^{aZ}	3.54 ± 0.06 ^{eY}	4.46 ± 0.02 ^{fX}	5.50 ± 0.05 ^{eW}	6.68 ± 0.05 ^{dV}
AN50	2.68 ± 0.15 ^{aZ}	4.18 ± 0.01 ^{bY}	5.26 ± 0.03 ^{cX}	6.59 ± 0.04 ^{dW}	6.73 ± 0.13 ^{dV}
V100	2.68 ± 0.15 ^{aZ}	4.04 ± 0.04 ^{cY}	4.88 ± 0.20 ^{eX}	6.87 ± 0.05 ^{bW}	7.15 ± 0.10 ^{cV}
DN4	2.63 ± 0.05 ^{aY}	4.13 ± 0.05 ^{bcX}	5.02 ± 0.14 ^{dW}	6.71 ± 0.04 ^{cV}	6.64 ± 0.13 ^{dV}
DN47 ²	2.62 ± 0.18 ^{aZ}	3.92 ± 0.07 ^{dY}	4.48 ± 0.13 ^{fX}	6.80 ± 0.08 ^{cW}	7.19 ± 0.04 ^{cV}
INBAC	2.76 ± 0.14 ^{aZ}	4.76 ± 0.09 ^{aY}	5.53 ± 0.03 ^{bX}	6.54 ± 0.03 ^{dW}	8.12 ± 0.02 ^{bV}
CV (%)	5.09	1.64	2.04	0.76	1.19

TRT: tratamiento, CV: coeficiente de variación.

¹ Concentración usada 0.5%. ² Concentración usada 0.3%. DN47: lactato de sodio, acetato de sodio y diacetato de sodio. N50: lactato de sodio y acetato de sodio. V100: acetato de sodio natural. DN4: lactato de sodio y diacetato de sodio. INBAC: producto de la marca Peisa® con un contenido de 2% de nisina en la formulación.

^{a-f} Medias con letra minúscula diferente en la misma columna representan diferencia estadística entre tratamientos en el mismo día ($P < 0.05$).

^{v-z} Medias con letra mayúscula diferente en la misma línea representan diferencia estadística entre los días de evaluación ($P < 0.05$).

Cuadro 15. Conteo en logaritmos de *Listeria innocua* bajo prueba desafío con inoculación inicial de 1 Log UFC/g.

TRT	Días de evaluación				
	0	7	14	21	28
Control	0.93 ± 0.07^{aZ}	3.75 ± 0.10^{aY}	4.51 ± 0.04^{aX}	5.47 ± 0.01^{aW}	6.08 ± 0.05^{aV}
DN47 ¹	0.89 ± 0.05^{aX}	2.31 ± 0.23^{bW}	2.54 ± 0.07^{cVW}	2.76 ± 0.07^{cV}	2.73 ± 0.10^{cdV}
AN50	0.90 ± 0.04^{aX}	2.27 ± 0.20^{bW}	2.51 ± 0.06^{cVW}	2.72 ± 0.04^{cV}	2.72 ± 0.16^{cdV}
V100	0.91 ± 0.06^{aY}	2.52 ± 0.17^{bX}	2.65 ± 0.06^{cWX}	2.72 ± 0.04^{cVW}	2.89 ± 0.05^{cV}
DN4	0.90 ± 0.04^{aX}	2.43 ± 0.09^{bW}	2.63 ± 0.05^{cVW}	2.76 ± 0.04^{cV}	2.66 ± 0.16^{cdV}
DN47 ²	0.93 ± 0.03^{aW}	3.69 ± 0.25^{bV}	3.77 ± 0.17^{bV}	3.80 ± 0.15^{bV}	3.78 ± 0.13^{bV}
INBAC	0.91 ± 0.05^{aX}	2.27 ± 0.20^{bX}	2.46 ± 0.12^{cVW}	2.62 ± 0.11^{cV}	2.56 ± 0.11^{dV}
CV (%)	5.6	6.68	3.08	2.43	3.19

TRT: tratamiento, CV: coeficiente de variación.

^{a-c} Medias con letra minúscula diferente en la misma columna representan diferencia estadística entre tratamientos en el mismo día ($P < 0.05$).^{v-z} Medias con letra mayúscula diferente en la misma línea representan diferencia estadística entre los días de evaluación ($P < 0.05$).

La mayoría de los antimicrobianos alimentarios son únicamente bacteriostáticos bajo un sistema de conservación que impide el crecimiento de microorganismos, o fungistáticos. En lugar de bactericidas o fungicidas que eliminan gérmenes y hongos. Lo anterior limita su efectividad sobre la conservación de alimentos. Haciendo necesaria la combinación de medidas de refrigeración como barrera de control.

Comparación de modelos predictivos.

Existe una correlación alta positiva (Cuadro 16) entre los modelos predictivos de crecimiento bacteriano al compararlos con el crecimiento en placa mediante incubación y conteo. Se puede identificar una mayor aproximación con un 93.65% mediante el modelo Galactic al conteo en placa. Además, este modelo permite al usuario insertar directamente el producto que utiliza y la concentración del mismo, sin necesidad de convertir a su fórmula molecular como el modelo FSSP. La versatilidad y rapidez del modelo genera resultados que pueden ser utilizados para toma de decisiones en proceso y respaldo de documentos de verificación. Sin embargo, estadísticamente, generan resultados diferentes en cuanto a la cantidad en logaritmo de las unidades formadoras de colonia por gramo de producto (UFC/g).

Cuadro 16. Correlación entre modelos predictivos de crecimiento bacteriano y conteo en placa para *Listeria*.

	GALACTIC	FSSP^o
PLACA	0.93650*	0.91079*
GALACTIC		0.87936*

* Correlación alta positiva ($P < 0.05$).

^o Food Spoilage and Safety Predictor.

Al comparar los resultados obtenidos en el conteo en placa y los modelos predictivos bajo las condiciones dadas del producto y características fisicoquímicas específicas, se observó que existen diferencias significativas en la cantidad de bacterias expresadas en Log UFC/g de *Listeria* ($P < 0.05$); no obstante, el uso de este tipo de herramientas se justifica por la facilidad y rapidez de la obtención de datos que pueden respaldar procesos o concentraciones de productos usadas en la formulación de alimentos.

En la Figura 2 se muestra el comportamiento del crecimiento de *Listeria* de acuerdo a los resultados obtenidos en el modelo Galactic para el producto DN47 (0.5%). La Figura 3 es el resultado obtenido en el programa FSSP para el mismo producto como conservante. Los modelos predictivos de crecimiento microbiano tienen aplicaciones al ser debidamente validados.

Algunas de las aplicaciones más importantes radican en la predicción del efecto sobre las características del producto y condiciones de almacenamiento, sobrevivencia e inactivación de bacterias con un enfoque en el desarrollo o reformulación de productos.

Además, representan una herramienta en la elaboración de programas HACCP estableciendo los límites para los puntos críticos de control, en el establecimiento de objetivos de seguridad alimentaria y sobre todo en la educación o capacitación del personal de producción siendo de fácil acceso.

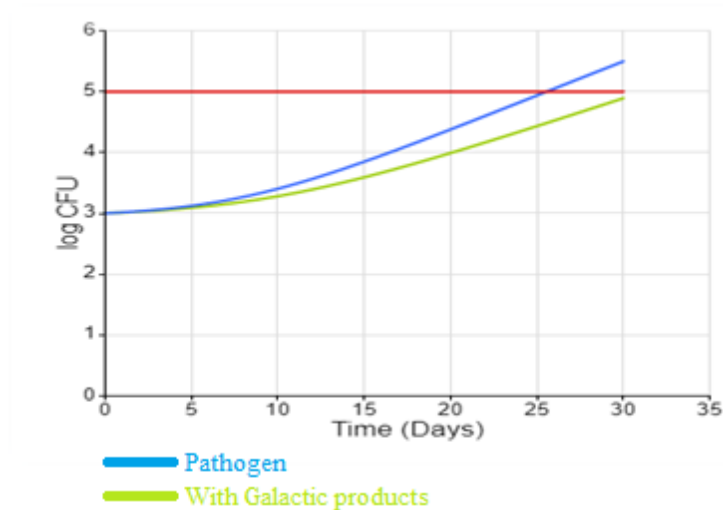


Figura 2. Resultados en modelo predictivo Galactic: comportamiento de *Listeria* con un inóculo inicial de 3 Log UFC/g en salchichas de pollo almacenadas en refrigeración a 6 °C.

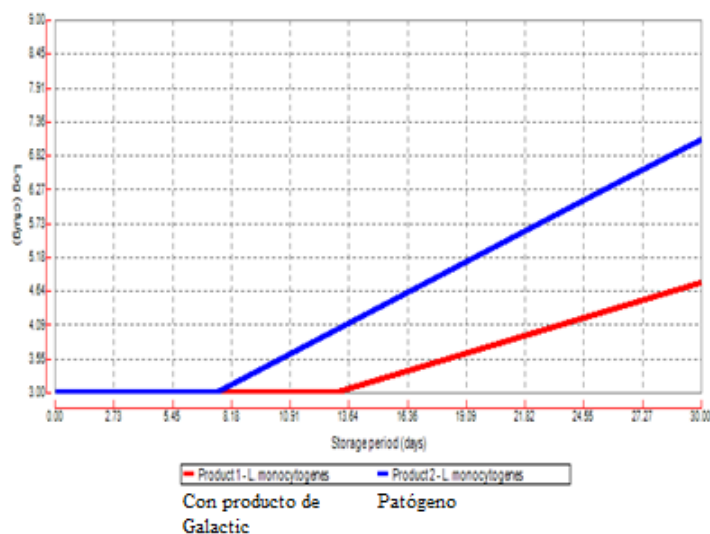


Figura 3. Resultados en modelo predictivo FSSP: comportamiento de *Listeria* con un inóculo inicial de 3 Log UFC/g en salchichas de pollo almacenadas en refrigeración a 6 °C.

La tendencia en diferencias entre modelos y conteo en placa puede observarse tanto para el Control en la Figura 4. Siendo el conteo en placa el que alcanza valores más altos de la concentración del microorganismo en Log UFC/g, seguido por el modelo FSSP que demuestra un mayor efecto protector del conservante utilizado sobre el crecimiento de

Listeria durante el almacenamiento. En el caso del modelo Galactic, el efecto del conservante se potencia y como resultado el nivel de *Listeria* resulta menor que los anteriores.

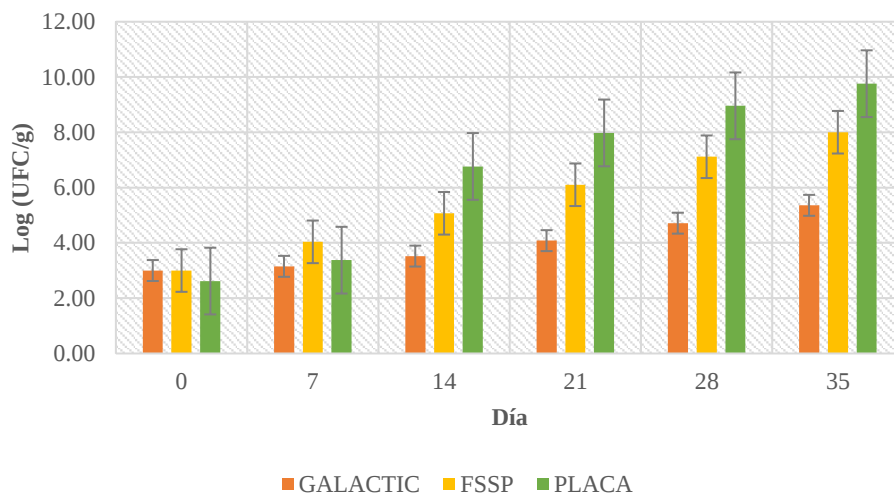


Figura 4. Comportamiento de *Listeria* con un inóculo inicial de 3 Log UFC/g en salchichas de pollo almacenadas en refrigeración a 6 °C en modelos predictivos Galactic y FSSP (Food Spoilage and Safety Predictor) y conteo en placa para el tratamiento control (sin conservantes).

El comportamiento en cuanto a crecimiento de *Listeria* en los modelos predictivos es similar para los tratamientos. Manteniendo un comportamiento incremental y siendo el conteo en placa el que genera los promedios más altos.

4. CONCLUSIONES

- Las características fisicoquímicas de las salchichas de pollo adicionadas con los conservantes no presentan cambios estadísticamente significativos durante el almacenamiento. Mientras el crecimiento de mesófilos aerobios totales se reduce en presencia de mezclas de lactatos, acetatos y diacetatos, más no al utilizar bajas concentraciones de nisina.
- El comportamiento de los distintos tratamientos en cuanto al control de crecimiento de *Listeria innocua* (cepa no patogénica), utilizada en la prueba desafío como referencia de *Listeria monocytogenes*, es influenciado por la matriz propia del material, presentando un comportamiento de crecimiento similar, independiente del tratamiento. Mientras que la concentración del conservante tiene efectos inversos sobre el crecimiento expresado en Log UFC/g.
- Los modelos predictivos Galactic y FSSP representan una herramienta potencial de uso en la industria presentando tendencias similares al crecimiento bacteriano en Log UFC/g de *Listeria* en placa evaluado por periodos de tiempo similares.

5. RECOMENDACIONES

- Evaluar el efecto de varias concentraciones de las mezclas orgánicas utilizadas a base de lactato, acetato y diacetato incluyendo nisina, en diferentes matrices alimenticias.
- Incluir el factor temperatura en varios niveles a fin de identificar el efecto combinado del mismo sobre la inhibición de crecimiento bacteriano.
- Identificar la presencia de gases y compuestos provenientes de la degradación por presencia de bacterias ácido lácticas después de los 35 días de almacenamiento a temperaturas de refrigeración.

6. LITERATURA CITADA

AINIA (Instituto tecnológico de la Industria Agroalimentaria) 2011. Chemital; modelos predictivos para la evaluación conservantes frente a *Listeria monocytogenes*. España; [consultado 2018 ene 23]. <http://www.ainia.es/casos-de-exito/chemital-modelos-predictivos-para-la-evaluacion-conservantes-frente-a-listeria-monocytogenes/>

ANMAT (Administración Nacional de medicamentos, alimentos y tecnología médica) 2011. Guía de Interpretación de resultados microbiológicos en alimentos. [Consultado 2018 jun 01]. http://www.anmat.gov.ar/Alimentos/Guia_de_interpretacion_resultados_microbiologicos.pdf

Ayala J, Wang S, Wang C y González G. 2007. High oxygen treatment increases antioxidant capacity and postharvest life of strawberry fruit. *Food Technol. Biotech.* 45:166-173

Arboleda AM. 2008. Percepciones del color y de la forma de los empaques: Una experiencia de aprendizaje. *Estudios Gerenciales.* 24(106):31–45. doi:10.1016/S0123-5923(08)70030-5.

Baranyi J, Roberts TA. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal on Food microbiology.* 23:277-294.

Cabeza EA. 2011. Aplicación de la microbiología predictiva para la determinación de la vida útil de los alimentos [Tesis]. Universidad de Pamplona, Colombia. 21 p.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention) 2017. Selected multistate outbreaks. *Listeria* (listeriosis); [Consultado 2018 ene 23]. <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/index.html>

Duret S, Guillier L, Hoang H-M, Flick D, Laguerre O. 2014. Identification of the significant factors in food safety using global sensitivity analysis and the accept and reject algorithm: Application to the cold chain of ham. *Int J Food Microbiol.* 180:39–48. eng. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.009.

Feiner G. 2006. Cooked sausages. In: *Feiner G ed. Meat products handbook, practical science and technology.* Cambridge, England. Burlington: Elsevier Science. p. 239-285.

Forsythe F. 2002. Application of microbiological risk assesment. In: *Spencer WH ed. The microbiological risk assessment of food.* Oxford, UK: Blackwell. p. 113-173.

Freixanet L. (2010). Aditivos e ingredientes en la fabricación de productos cárnicos cocidos de músculo entero. Metalquimia SA Artículos tecnológicos. Editado por Metalquimia SA Gerona, España. [Consultado 2018 may 17]. <http://es.metalquimia.com/upload/document/article-es-12.pdf>

FSIS (Food Safety and Inspection Service) 2004. Characteristics and Manufacturing Processes. [Consultado 2018 ene 22]. Disponible en: http://www.fsis.usda.gov/PDF/PHVcRegulated_Industries.pdf

FSIS (Food Safety and Inspection Service). 2014. FSIS compliance guideline; controlling *Listeria monocytogenes* in post-lethality exposed ready-to-eat meat and poultry products. *Listeria* guideline; [consultado 2018 ene 21]. <http://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/sanidadExterior/docs/Controlling-Lm-RTE-Guideline.pdf>

FSIS (Food Safety and Inspection Service) 2016. FSIS Best practices guidance for controlling *Listeria monocytogenes* (*Lm*) in retail delicatessens. USDA (United States Department of Agriculture); [Consultado 2018 ene 23]. <https://www.google.be/search?q=usda&oq=usda&aqs=chrome..69i57j69i60l2j0l3.1033j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8>

FSSP (Food Spoilage and Safety Predictor) 2014. FSSP for windows. [Consultado 2018 ene 20]. <http://fssp.food.dtu.dk/>

Gabas AL, Telis J, Giraldo GI, Telis VRN. 2009. Propiedades termodinámicas de sorción de agua de la pulpa de lulo en polvo con encapsulantes. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 29(4):911–918. doi:10.1590/S0101-20612009000400032.

García Y, García A, Hernández A, Pérez J. 2011. Estudio de la variación del índice de color durante la conservación de la piña variedad Cayena Lisa a temperatura ambiente. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias.* 20(4):12–16.

Gram L, Ravn L, Rasch M, Bruhn JB, Christensen AB, Givskov M. 2002. Food spoilage; interactions between food spoilage bacteria. *Int J Food Microbiol.* 78(1-2):79–97. doi:10.1016/S0168-1605(02)00233-7.

Grande MA, Lucas R, López MC, Pérez R, Gálvez A. 2011. Bioconservación de alimentos cárnicos. *Real academia de ciencias veterinarias de Andalucía Oriental.* 24(1):111-123.

Gómez L, Ponce E, Ermlund R, Rubio MS. 2013. Efecto de antimicrobianos naturales sobre la estabilidad físico-química, microbiológica y sensorial de hamburguesas de res mantenidas en refrigeración. *Revista Mexicana de ciencias pecuarias.* 4(3):255-270.

Gibbs, P.A., Williams, A.P., 1990. In: *Using Mathematics for Shelf Life Prediction*, Food Technol. Int, Europe. p. 287–290.

Holley RA, Patel D. 2005. Improvement in shelf life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*. 22(4):273–292. doi:10.1016/j.fm.2004.08.006.

Honikel K. 1998. Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat science*. 49(4):447-457.

Jemmi T y Stehan R. 2006. *Listeria monocytogenes*; foodborne pathogen and hygiene indicator. US National Library of Medicine National Institute of Health. *Rev Sci Tech*. 25(2):571-80.

Lozano AG, Arvizu S, Padilla JJ, Pérez A, Ibarra JL. 2009. Evaluación del desarrollo microbiano y comportamiento a diferentes condiciones de *Leuconostoc mesenteroides*. Escuela de ciencias biológicas, México; [consultado 2018 may 29]. http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-009/OctavoVerano_38/19_Lozano_Ana.pdf

Martínez A, Cepeda A, Herrera A, Alonso C. 2011. Informe del comité científico de la agencia española de seguridad alimentaria y nutrición (AESAN) en relación a los estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en determinados productos alimenticios. AESAN-2011-003. No. 14. p. 43-63.

Martínez, K. 2016. Applications of predictive microbiology on food industry. Departamento de Microbiología. Universidad de la Laguna (ULL); [consultado 2018 abr 18]. <https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/3186/Aplicaciones%20de%20la%20Microbiologia%20Predictiva%20en%20la%20Industria%20Alimentaria.pdf?sequence=1>

OMA (Official Methods of Analysis of AOAC International). 2015. http://www.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC/Publications/Official_Methods_of_Analysis/AOAC_Member/Pubs/OMA/AOAC_Official_Methods_of_Analysis.aspx

Ossa J, Coral A, Vanegas L. 2010. Microbiota de jamones de cerdo cocidos asociada al deterioro por abombamiento del empaque. *Revista MVZ Córdoba*. 15(2):2078-2086. [Consultado 2018 feb 12]. <http://www.redalyc.org/pdf/693/69315067006.pdf>

Reglamento de la Conformidad Europea. 2005. Reglamento (CE) N0. 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005 , relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (Texto pertinente a efectos del EEE). *Official Journal of the European Union*. 48(338):1-26.

RTCA (Reglamento Técnico Centroamericano). 2012. Alimentos y bebidas procesadas; aditivos alimentarios. Codex Stan 192-1995. [Consultado 2018 jul 15]. <http://www.mspas.gob.gt/images/files/drca/normativasvigentes/RTCAAditivosAlimentarios.pdf>

RTCA (Reglamento Técnico Centroamericano). 2017. Alimentos, criterios microbiológicos para la inocuidad de los alimentos. [Consultado 2018 jul 15]. <https://mici.gob.pa/imagenes/pdf/RTCA%20Criterios%20Microbiol%C3%B3gicos%20consulta%20p%C3%ABlica%20mayo%202017.pdf>

Santos EM, Jiménez P, Sánchez I, Castro J, Zuñiga, A. 2010. Aplicación de sales de ácidos orgánicos en la conservación de carne de conejo. México. Universidad de Guanajuato.
Schöbitz R, Ciampi L, Nahuelquin Y. 2009. *Listeria monocytogenes* un peligro latente para la industria alimentaria. Agrosur. 37(1):1-8. doi:10.4206/agrosur.2009.v37n1-01.

Silva M, y Lidon F. 2015. Food preservatives; an overview on applications and side effects. Emirates Journal of Food and Agriculture. 2016. 28(6):366-373. doi:10.9755/ejfa.2016-04-351

Thermo Scientific. 2018. Dehydrated culture media. Oxoid Microbiology Products. [Consultado 2018 oct 24]. Disponible en http://www.oxoid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1153

Vaclavik V y Christian E. 2014. Essentials of food Science, 4th edition, Food Science Text Series. Springer Science + Business Media New York. doi:10.1007/978-1-4614-9138-5_18.

Vidal JL. 1997. Tecnología de los embutidos curados, CYTA. Journal of Food, 1(5):129-133. doi:10.1080/11358129709487572

Westland S. 2004. L* a* b* colour space. Somerset Villa, 106 London Road, Newcastle-under-Lyme. [Consultado 2018 ago 15]. Disponible en: www.colourware.co.uk.

7. ANEXOS

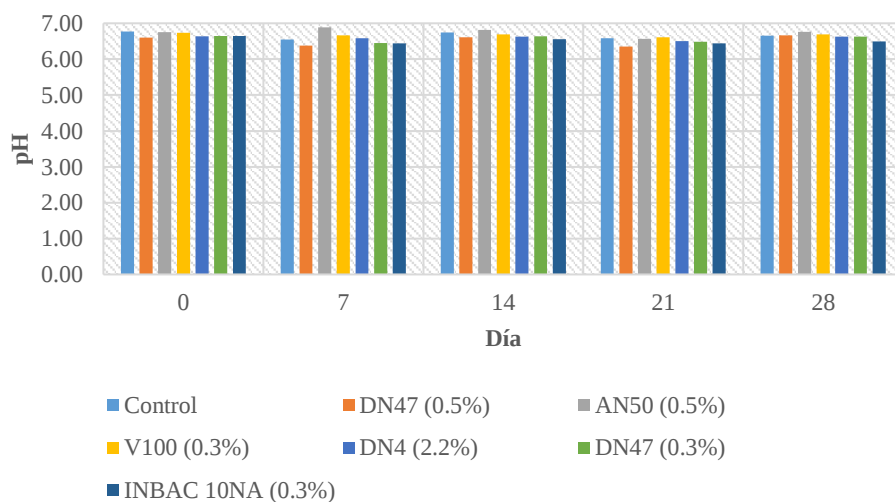
Anexo 1. Especificaciones de empaque.

AFTER EACH DAY OF USE PLEASE RUN THE CLEANING PROGRAM
 (Turn left the button until all lights are blinking)
 It cleans the oil of the machine for 20 minutes

Vacuum Programs

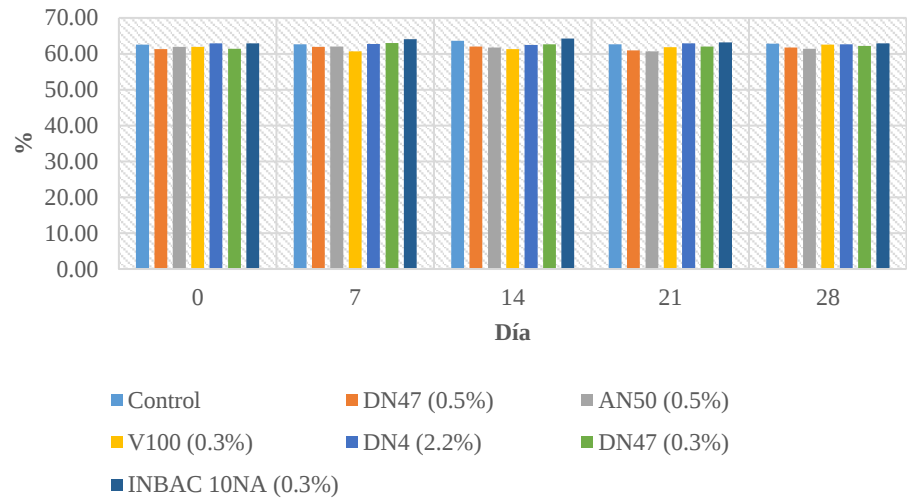
Program	Use	Vide (mBar)	Vide + (sec)	Gaz (mBar)	Seal (sec)	Seal + (sec)	Soft air (sec)
1	Steak	10	off	off	2	off	50
2	Sausages	50	off	off	2	off	50
3	Solid pieces	5	5	off	2	off	off
4	1/2 vacuum	500	off	off	2	off	off
5	PLA	10	off	off	5	off	50
6	Emulsion	200	off	off	2	off	off
7	MAP (Gaz Aligal 13 - 30% CO2 & 70% N2) TURN ON THE GAS BOTTLE BEFORE USE	20	off	on (500 mBar)	2	off	off
8							
9							

Anexo 2. Comportamiento del pH en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.



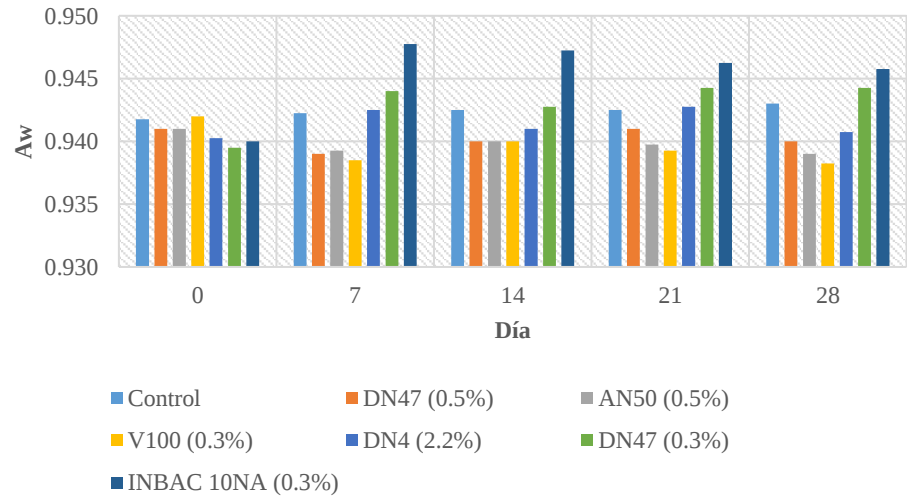
DN47: lactato de sodio, acetato de sodio y diacetato de sodio. N50: lactato de sodio y acetato de sodio. V100: acetato de sodio natural. DN4: lactato de sodio y diacetato de sodio. INBAC: producto de la marca Peisa® con un contenido de 2% de nisina en la formulación.

Anexo 3. Comportamiento de la humedad expresada en porcentaje (%) en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.



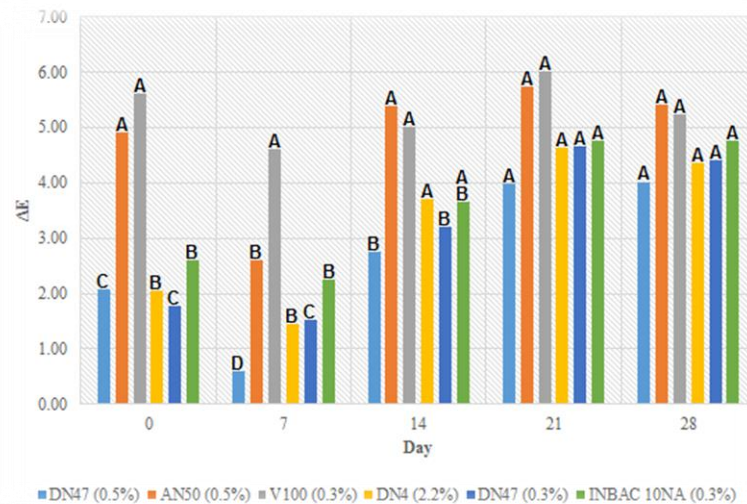
DN47: lactato de sodio, acetato de sodio y diacetato de sodio. N50: lactato de sodio y acetato de sodio. V100: acetato de sodio natural. DN4: lactato de sodio y diacetato de sodio. INBAC: producto de la marca Peisa® con un contenido de 2% de nisina en la formulación.

Anexo 4. Comportamiento de la actividad de agua en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.



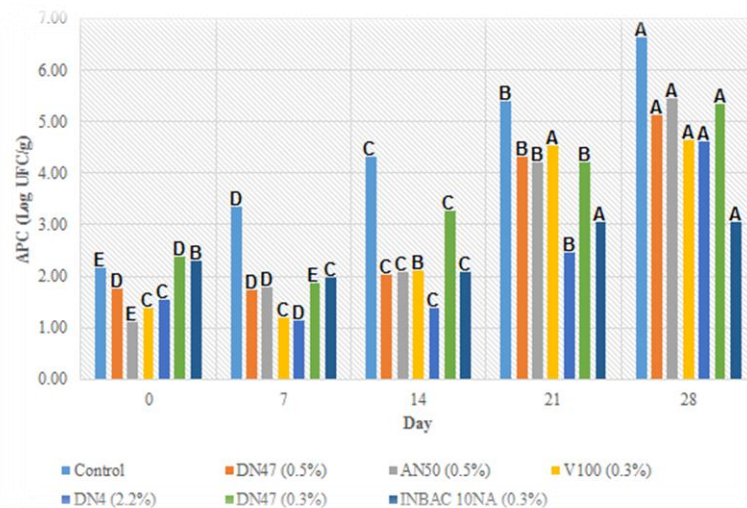
DN47: lactato de sodio, acetato de sodio y diacetato de sodio. N50: lactato de sodio y acetato de sodio. V100: acetato de sodio natural. DN4: lactato de sodio y diacetato de sodio. INBAC: producto de la marca Peisa® con un contenido de 2% de nisina en la formulación.

Anexo 5. Cambio en la intensidad del color en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.



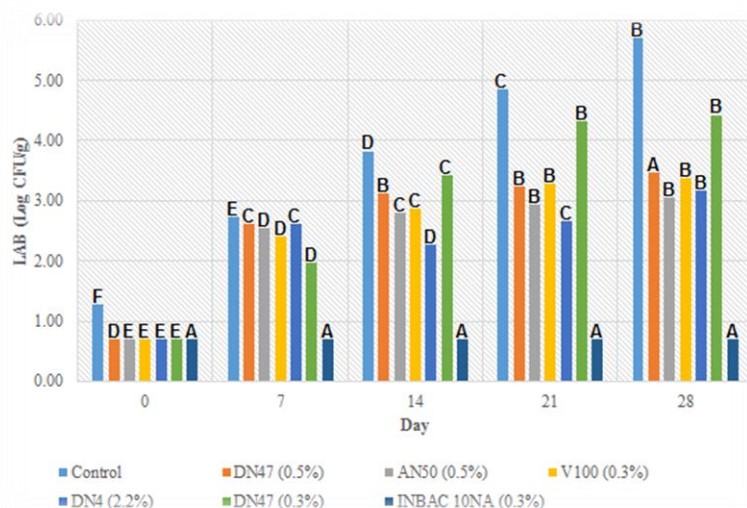
DN47: lactato de sodio, acetato de sodio y diacetato de sodio. N50: lactato de sodio y acetato de sodio. V100: acetato de sodio natural. DN4: lactato de sodio y diacetato de sodio. INBAC: producto de la marca Peisa® con un contenido de 2% de nisina en la formulación.
^{a-c} Barras con letra diferente representan diferencia estadística entre tratamientos ($P < 0.05$).

Anexo 6. Comportamiento de las bacterias mesófilas aerobias en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.



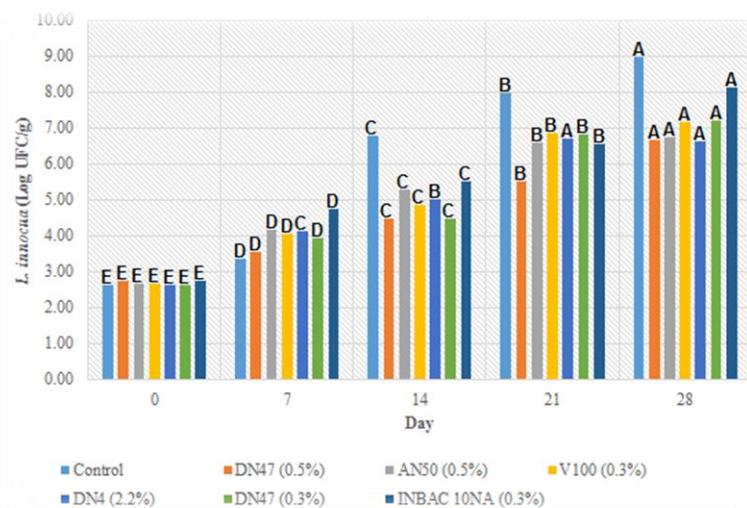
DN47: lactato de sodio, acetato de sodio y diacetato de sodio. N50: lactato de sodio y acetato de sodio. V100: acetato de sodio natural. DN4: lactato de sodio y diacetato de sodio. INBAC: producto de la marca Peisa® con un contenido de 2% de nisina en la formulación.
^{a-c} Barras con letra diferente representan diferencia estadística entre tratamientos ($P < 0.05$).

Anexo 7. Comportamiento de las bacterias ácido lácticas en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.



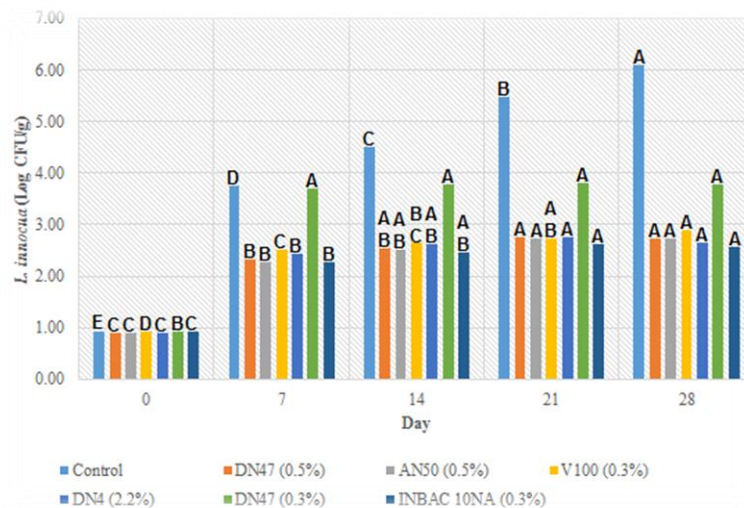
DN47: lactato de sodio, acetato de sodio y diacetato de sodio. N50: lactato de sodio y acetato de sodio. V100: acetato de sodio natural. DN4: lactato de sodio y diacetato de sodio. INBAC: producto de la marca Peisa® con un contenido de 2% de nisina en la formulación.
^{a-c} Barras con letra diferente representan diferencia estadística entre tratamientos ($P < 0.05$).

Anexo 8. Comportamiento de *L. innocua* en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.



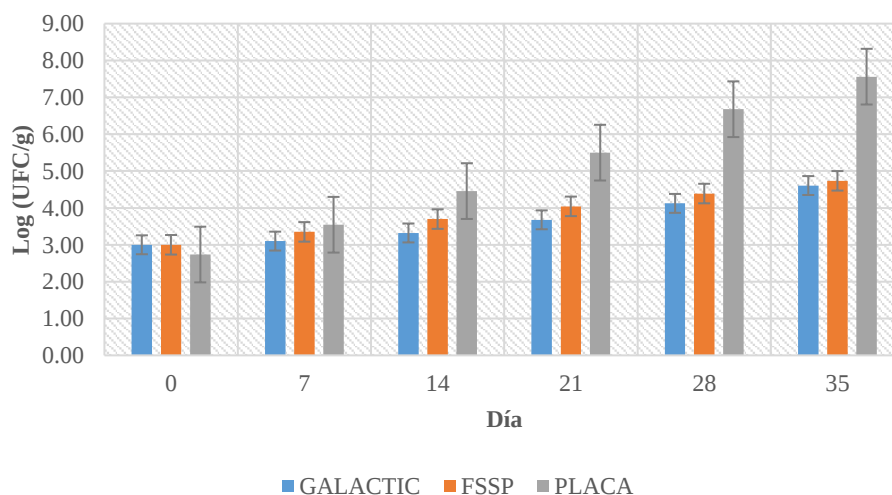
DN47: lactato de sodio, acetato de sodio y diacetato de sodio. N50: lactato de sodio y acetato de sodio. V100: acetato de sodio natural. DN4: lactato de sodio y diacetato de sodio. INBAC: producto de la marca Peisa® con un contenido de 2% de nisina en la formulación.
^{a-c} Barras con letra diferente representan diferencia estadística entre tratamientos ($P < 0.05$).

Anexo 9. Comportamiento de *L. innocua* en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.



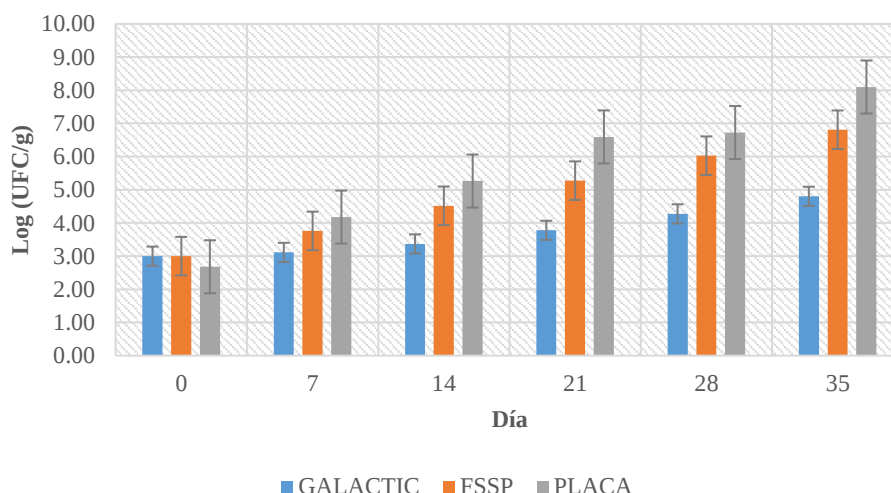
DN47: lactato de sodio, acetato de sodio y diacetato de sodio. N50: lactato de sodio y acetato de sodio. V100: acetato de sodio natural. DN4: lactato de sodio y diacetato de sodio. INBAC: producto de la marca Peisa® con un contenido de 2% de nisina en la formulación.
^{a-c} Barras con letra diferente representan diferencia estadística entre tratamientos ($P < 0.05$).

Anexo 10. Crecimiento bacteriano para los modelos predictivos y conteo en placa para el tratamiento DN47 (0.5 %) en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.



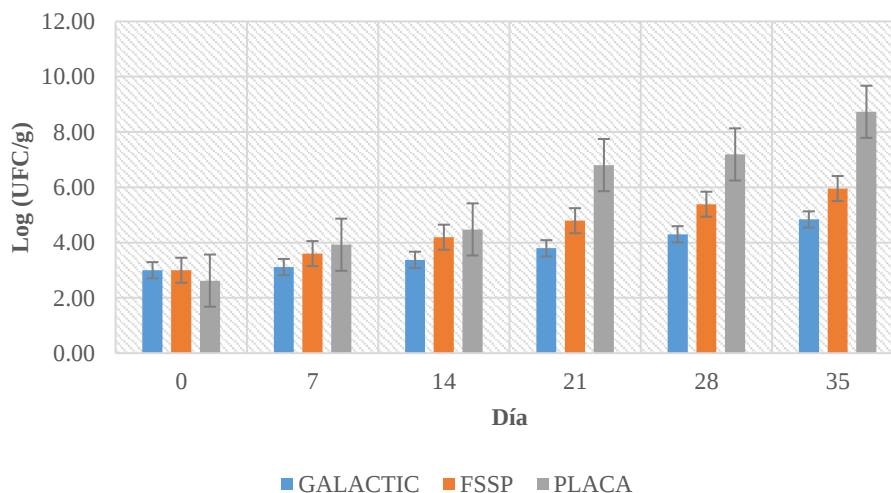
DN47: lactato de sodio, acetato de sodio y diacetato de sodio. N50: lactato de sodio y acetato de sodio. V100: acetato de sodio natural. DN4: lactato de sodio y diacetato de sodio. INBAC: producto de la marca Peisa® con un contenido de 2% de nisina en la formulación.
^{a-c} Barras con letra diferente representan diferencia estadística entre tratamientos ($P < 0.05$).

Anexo 11. Crecimiento bacteriano para los modelos predictivos y conteo en placa para tratamiento AN50 (0.5 %) en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.



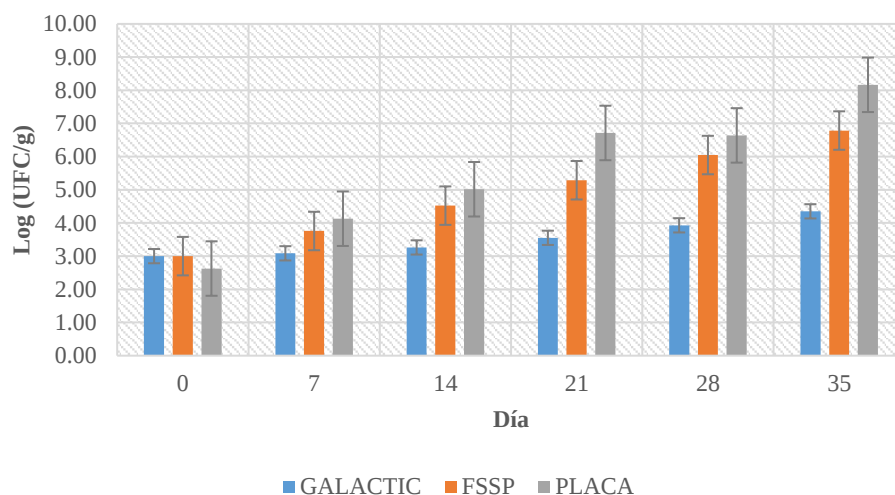
DN47: lactato de sodio, acetato de sodio y diacetato de sodio. N50: lactato de sodio y acetato de sodio. V100: acetato de sodio natural. DN4: lactato de sodio y diacetato de sodio. INBAC: producto de la marca Peisa® con un contenido de 2% de nisina en la formulación.
^{a-c} Barras con letra diferente representan diferencia estadística entre tratamientos ($P < 0.05$).

Anexo 12. Crecimiento bacteriano para los modelos predictivos y conteo en placa para tratamiento DN47 (0.3%) en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.



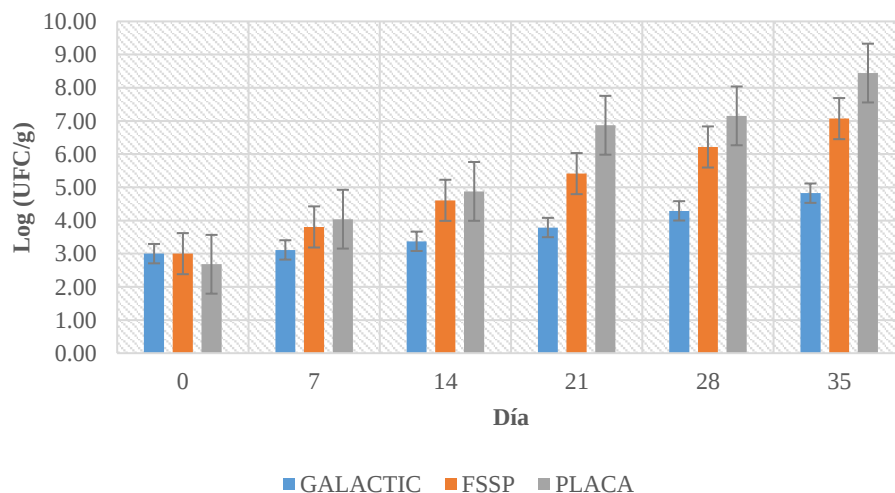
DN47: lactato de sodio, acetato de sodio y diacetato de sodio. N50: lactato de sodio y acetato de sodio. V100: acetato de sodio natural. DN4: lactato de sodio y diacetato de sodio. INBAC: producto de la marca Peisa® con un contenido de 2% de nisina en la formulación.
^{a-c} Barras con letra diferente representan diferencia estadística entre tratamientos ($P < 0.05$).

Anexo 13. Crecimiento bacteriano para los modelos predictivos y conteo en placa para tratamiento DN4 (2.2%) en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.



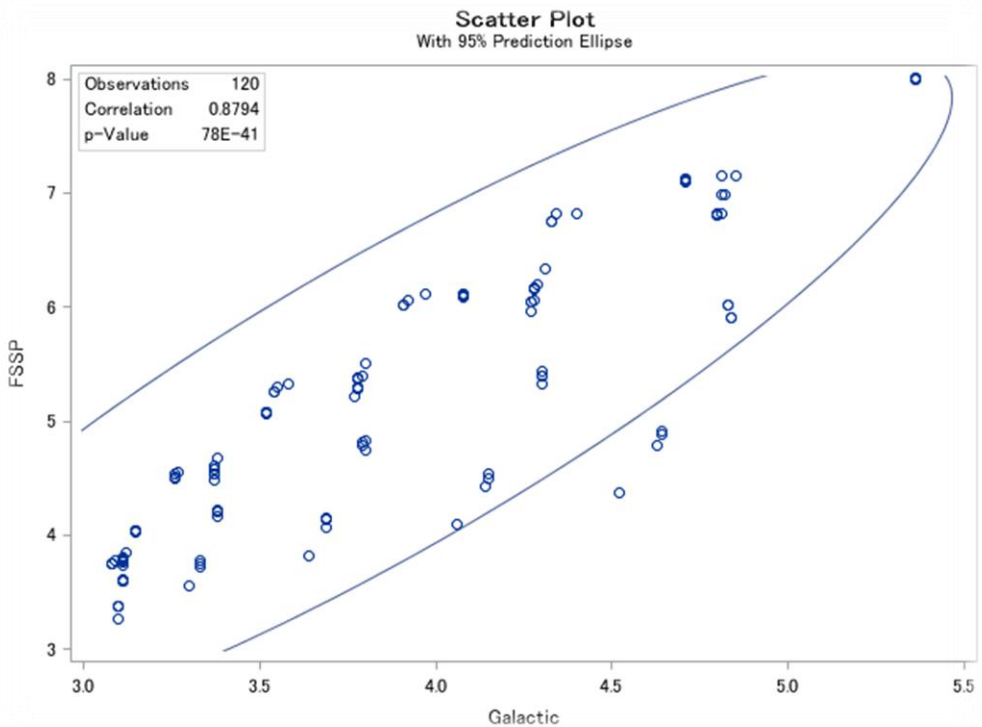
DN47: lactato de sodio, acetato de sodio y diacetato de sodio. N50: lactato de sodio y acetato de sodio. V100: acetato de sodio natural. DN4: lactato de sodio y diacetato de sodio. INBAC: producto de la marca Peisa® con un contenido de 2% de nisina en la formulación.
^{a-c} Barras con letra diferente representan diferencia estadística entre tratamientos ($P < 0.05$).

Anexo 14. Crecimiento bacteriano para los modelos predictivos y conteo en placa para tratamiento V100 (0.3%) en salchichas adicionadas con diferentes conservantes después de 28 días almacenadas en refrigeración 6 °C.

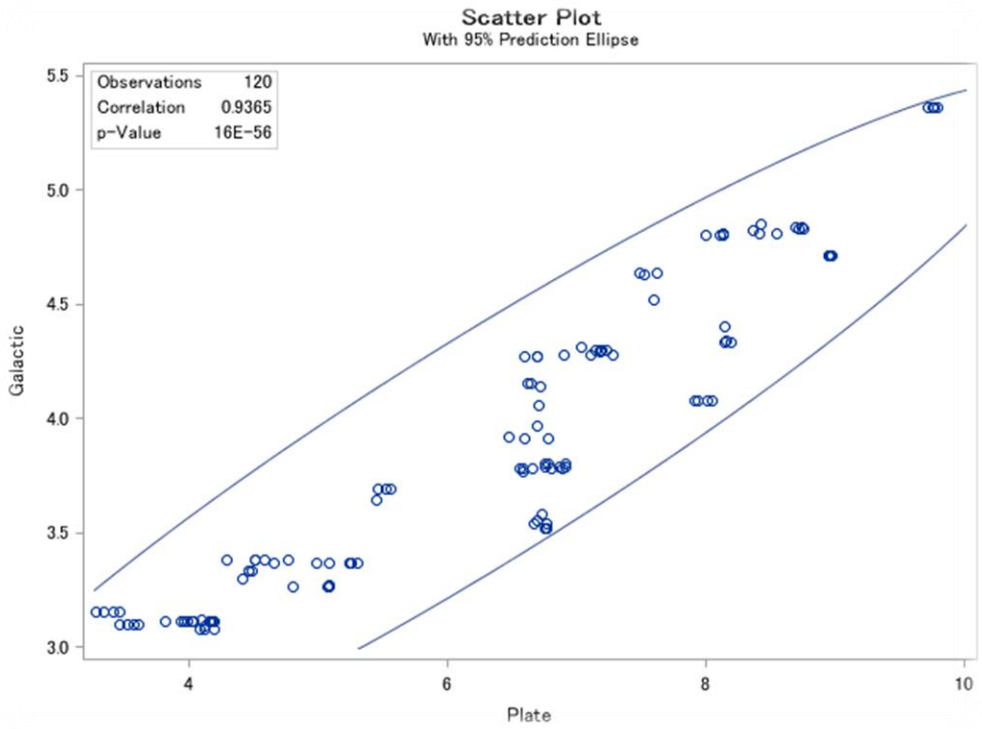


DN47: lactato de sodio, acetato de sodio y diacetato de sodio. N50: lactato de sodio y acetato de sodio. V100: acetato de sodio natural. DN4: lactato de sodio y diacetato de sodio. INBAC: producto de la marca Peisa® con un contenido de 2% de nisina en la formulación.
^{a-c} Barras con letra diferente representan diferencia estadística entre tratamientos ($P < 0.05$).

Anexo 15. Distribución de datos para correlación entre modelos FSSP y Galactic



Anexo 16. Distribución de datos para correlación entre modelo Galactic y conteo en placa.



Anexo 17. Distribución de datos para correlación entre conteo en placa y modelo FSSP.

