

EMPLEO DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILLUS* COMO CULTIVO BIOPROTECTOR. PARTE II.

Tatiana Beldarraín, Yamilé Moya, Soraya Piloto, Yamira Cepero, Aster Bruselas, Ramón Santos, María Aloida Guerra, Zobeida Frómata, Frank Rodríguez, Norma Vergara, Cecilia Carrillo y Carmen Casaña
Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria
Carretera al Guatao, km 3 ½, La Habana, Cuba, C.P. 19200.
E-mail: tatiana@iia.edu.cu

RESUMEN

Se evaluó la competitividad de cepa de *Lactobacillus acidophilus* LA16 frente a *Salmonella typhimurium* en chorizo. Para ello, se prepararon dos variantes del producto. La var. 1 fue la fórmula patrón, mientras que la var. 2 tuvo un inóculo de *Salmonella typhimurium* con una concentración de 3 unidades log. Los resultados señalan a *Lactobacillus acidophilus* LA16 como un cultivo bioprotector adecuado para el control de *Salmonella typhimurium* en chorizo.

Palabras clave: *Salmonella typhimurium*, *Lactobacillus acidophilus*, chorizo, bioprotección.

ABSTRACT

Use of *Lactobacillus acidophilus* as bioprotector starter. Part II.

The effectiveness of *Lactobacillus acidophilus* LA16 used as a bioprotective cultura against *Salmonella typhimurium* in "chorizo" was evaluated. Two variants were prepared, var.1 was the patron and in var 2, 3 unit log of *Salmonella typhimurium* strain was inoculated. The biopreservative culture *Lactobacillus acidophilus* LA16 was able to inhibit *Salmonella typhimurium* in chorizo.

Keywords: *Salmonella typhimurium*, *Lactobacillus acidophilus*, chorizo, bioprotection.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se asocian con la carne y muestran su efecto antagónico contra organismos patógenos y del deterioro. Su empleo para este fin ha ido ganando adeptos en esta década. Las BAL se consideran microorganismos GRAS (generalmente conocidos como seguros) pero su empleo sólo puede ir acompañado de buenas prácticas de manufactura (1). El empleo de estos cultivos protectores o sus metabolitos se conoce como biopreservación (2). Los cultivos antagónicos se adicionan a los alimentos con la finalidad de inhibir la presencia de microorganismos patógenos y extender la vida de anaquel, sin que cambien las propiedades sensoriales del producto (1, 3).

La mayoría de los estudios han demostrado la capacidad de las BAL de inhibir el crecimiento de un patógeno emergente, *Listeria monocytogenes* (4, 5). Sin embargo, en los estudios realizados se habla poco del efec-

***Tatiana Beldarraín Iznaga:** Licenciada en Microbiología (UH, 1996). Especialista en Carne y Productos Cárnicos (IIIA, 1999). Máster en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (IFAL, 2006). Investigador Agregado del grupo de Ciencias de la Vicedirección de Carne. Labora en la Calidad Microbiológica de Productos Cárnicos e Higiene de Plantas Procesadoras de Alimentos.

to que pudieran tener estas BAL sobre microorganismos del deterioro como las enterobacterias y sobre un patógeno de gran importancia para la salud, *Salmonella spp.* El objetivo de este trabajo fue estudiar la competitividad de cepa de *Lactobacillus acidophilus LA16* frente a *Salmonella spp.* en chorizo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar el estudio se eligió la cepa *Lactobacillus acidophilus LA16*, proveniente del banco del IIIA y de la que se conocen sus propiedades probióticas (6). Se eligió esta BAL porque se habían evaluado sus propiedades como cultivo iniciador para productos cárnicos y al ser una cepa productora de alta acidez así como los efectos que tiene sobre el pH, podría ser empleada como cultivo iniciador en un chorizo (7). Este se elaboró a partir de carnes semicongeladas.

La Tabla 1 muestra la formulación que se utilizó para su manufactura. A este se le adicionó la glucosa y el cultivo en las proporciones recomendadas. (7, 8).

Tabla 1. Formulación empleada para la elaboración del chorizo

Ingredientes	Porcentaje
Carne cerdo	89,72
Sales y condimentos	7,28
Cultivo iniciador y glucosa	3,00
Total	100,00

Las carnes se molieron por disco de 13 mm y se mezclaron según la formulación con el resto de los ingredientes durante 5 y 7 min. La masa obtenida se dejó macerar por 24 h, para volver a mezclar por 10 min, luego se dividió en dos porciones para preparar las dos variantes del experimento. Cada parte por separado se embutió en tripa natural de cerdo y se torció manualmente en porciones de 10 a 15 cm para alcanzar pesos de 90 ± 10 g. Los chorizos se colocaron en varillas a razón de 30 a 35 unidades y se ahumó a 30°C durante 3 h. El proceso de fermentación de los chorizos se realizó por dos semanas a temperatura y humedad relativa entre $18 \pm 2^\circ\text{C}$ y $50 \pm 5\%$, respectivamente, en condiciones artesanales, hasta que el producto tuviera el aroma, textura, sabor y peso deseados.

Para evaluar la capacidad de la BAL de inhibir *Salmonella typhimurium* en el chorizo, se prepararon dos variantes del producto. La var. 1 fue la fórmula patrón (Tabla 1), mientras que la var. 2 tenía un inóculo de *Salmonella typhimurium* con una concentración de 3 unidades log. A partir de las muestras tomadas de forma aséptica de las dos variantes de chorizo, se prepararon las diluciones y se realizaron los análisis microbiológicos por el método de la placa vertida. Se determinó la presencia de flora mesófila y psicrófila total, enterobacterias totales, hongos, levaduras y lactobacilos y se realizó conteo de *Salmonella spp.*

La determinación de mesófilos se realizó en medio ACP, incubándose las placas durante 48 h a $35 \pm 1^\circ\text{C}$. La determinación de psicrófilos se realizó también en ACP con incubación a 4°C por siete días. Las enterobacterias se determinaron en Agar violeta rojo bilis glucosa, las placas se incubaron a 37°C , durante 18 a 24 h. Para la determinación de lactobacilos se empleó Agar *dextrosa tripton*, se incubó a 37°C , durante 18 a 24 h.

Para la determinación de *Salmonella spp.* se empleó la base de medio cromogénico *Cromocen* AGN, siguiendo las indicaciones del productor. Para la interpretación de los resultados se tuvo en cuenta que las colonias de *Salmonella spp.* son rosado intensas con bordes rosados (9).

Para evaluar la calidad físico-química de las dos variantes de chorizo, se realizaron determinaciones de humedad (10), nitrito (11), cloruro de sodio (12), pH (13) y actividad de agua (14).

Este experimento se realizó en tres ocasiones y a todas las evaluaciones se les determinó la media y la desviación estándar. Para conocer el efecto que tiene el cultivo bioprotector sobre la bacteria patógena durante el tiempo de fermentación del chorizo, se realizó un análisis de varianza de clasificación simple tomando en cuenta la diferencia entre los conteos de enterobacterias y de *Salmonella spp.* al inicio y al final de la fermentación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las Tablas 2 y 3 muestran los resultados del tratamiento estadístico realizado a las var. 1 y 2 respecto a los conteos de *Salmonella spp.* y enterobacterias, respectivamente. En la var. 2 hay una disminución importante del conteo de salmonelas, que al inicio del estudio era significativamente mayor ($p \leq 0,05$) que los conteos obtenidos en la var. 1 y estaban en el orden de 3 unidades logarítmicas. Estos valores van decreciendo al pasar los días y al quinto día de maduración del chorizo no se observó presencia de *Salmonella spp.* en la var. 2. Esto podría estar dado por el efecto inhibitorio que tiene *Lactobacillus acidophilus* sobre *Salmonella spp.* Algunos investigadores han señalado que al cuarto día de fermentación se produce una inhibición de *Salmonella spp.* en chorizo tipo español elaborado con ácidos orgánicos y ellos atribuyen este resultado al efecto combinado de la disminución de actividad de agua, el pH y la temperatura de fermentación (15).

Tabla 2. Conteos de *Salmonella spp.* durante la fermentación del chorizo (n=3)

Variantes	Tiempo de fermentación (días)					
	1	2	3	4	5	15
var 1	1,00 ^c	1,00 ^c	1,00 ^c	1,00 ^c	1,00 ^c	1,00 ^c
var 2	3,48 ^a	2,95 ^a	2,18 ^{ab}	1,9 ^b	1,00 ^c	1,00 ^c

Var 1.- fórmula patrón.
 Var 2.- chorizo con *Salmonella spp.* inoculada
 Letras diferentes significan diferencias

En trabajos anteriores se observó que este patógeno se inhibió a los 12 días de fermentación en un chorizo sin ácidos adicionados, elaborado en las mismas condiciones y los autores atribuyeron los resultados a que el pH disminuyó sólo hasta 5,8 (15, 16).

La Tabla 3 refleja los resultados medios del conteo de enterobacterias en el tiempo. Hay una disminución del conteo en ambas variantes hasta 1 unidad logarítmica. Este valor se alcanza a los cinco días para la var. 1 y a los siete días en la variante que tiene el inóculo de salmonelas. La inhibición de enterobacterias a lo largo del proceso de maduración del chorizo implica una seguridad en el proceso tecnológico pues se garantiza la inhibición de la flora no deseada en el producto. Este resultado pudiera estar relacionado con la producción de sustancias antimicrobianas de la BAL adicionada, así como a los efectos que tiene el pH y la baja actividad de agua sobre la homeostasis de este grupo microbiano.

La Fig. 1 muestra los resultados medios de los conteos de mesófilos aerobios (CTAM), conteos de enterobacterias (CE), de lactobacilos (CLact) y de salmonelas (CSalm) en la var. 2 conforme pasa el tiempo. En el caso de las enterobacterias y salmonelas se observa una disminución de los conteos. Especialmente en el caso de *Salmonella spp.*, hay diferencias significativas a $p \leq 0,05$ respecto a los conteos iniciales, que estaban en 3,48 unidades logarítmicas, mientras que al final de la fermentación estaban en 1 unidad logarítmica. Esta diferencia en los conteos de este patógeno podrían deberse al efecto combinado de la disminución paulatina del pH y a la actividad de agua que estaba en 0,85; así como a algunas sustancias excretadas al medio por las BAL y que tienen un efecto sobre los microorganismos patógenos.

Tabla 3. Conteos de enterobacterias durante la fermentación del chorizo (n=3)

Variantes	Tiempo de fermentación (días)							
	1	2	3	4	5	6	7	15
Var. 1	3,79 ^a	2,78 ^{ab}	2,11 ^{bc}	1,93 ^c	1,00 ^d	1,00 ^d	1,00 ^d	1,00 ^d
Var. 2	3,58 ^a	3,2 ^a	2,95 ^{ab}	2,65 ^{ab}	2,30 ^{bc}	1,72 ^c	1,00 ^d	1,00 ^d

Var 1.- fórmula patrón. , Var 2.- chorizo con *Salmonella spp.* inoculada
 Letras diferentes significan diferencias significativas a $p < 0,05$

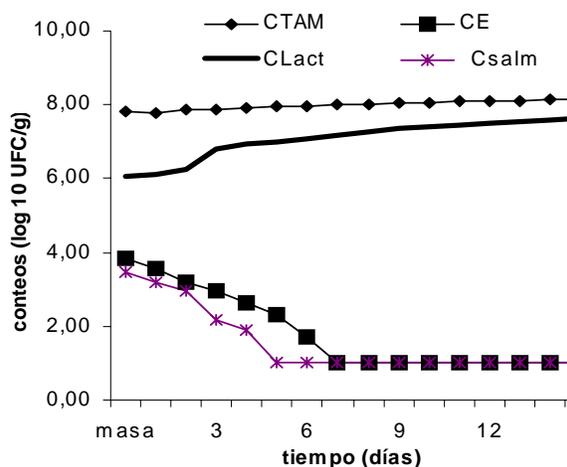


Fig. 1. Conteos microbianos en la Var. 2 de chorizo.

Con el tiempo de fermentación hay una disminución de conteos de psicrófilos y levaduras. A los efectos del trabajo estos grupos microbianos no son de interés. Sin embargo, sí hay que destacar que dentro de los psicrófilos se encuentran géneros microbianos que son patógenos.

La Tabla 4 muestra los valores medios y las desviaciones estándares de los análisis físico-químicos de caracterización de ambas variantes de chorizo al inicio y al final de la fermentación. Al inicio los valores de humedad estaban entre 58 y 59 % y al final de la maduración del producto disminuyen a 32 a 34 %. Este valor se corresponde con los informados para productos similares elaborados con ácidos orgánicos (15, 16). Es

de notar la influencia que tienen estos valores de humedad sobre la cantidad de agua disponible que tienen los microorganismos, lo que favorece la inhibición de su crecimiento.

La Fig. 2 refleja que durante la fermentación, se produce una disminución del pH, obteniéndose valores medios finales de 5,32 para la var. 1 y 5,35 para la var. 2, los que se encuentran por debajo de 5,5, valor informado en la literatura como seguro para esta tecnología (15, 17). La Fig. 3 muestra que en el proceso de secado se logra, también, una notable reducción de la actividad de agua en ambas variantes, de 0,96 a 0,86 en la var. 1 y de 0,98 a 0,85 en la var. 2. Este valor constituye un obstáculo insuperable para *Salmonella typhimurium*, que no sobrevive a valores inferiores a 0,94.

Con este estudio se evidencia el efecto que tiene el empleo de *Lactobacillus acidophilus LA16* sobre *Salmonella typhimurium*. Esto, unido al control estricto de la temperatura de fermentación artesanal, el proceso tecnológico, así como partir de materias primas de buena calidad microbiológica y la combinación de los valores de actividad de agua y pH, implica una seguridad en el proceso tecnológico que garantiza la inhibición de *Salmonella spp.* en un producto fermentado como el chorizo.

Desde un punto de vista de seguridad alimentaria, el cultivo inoculado inhibe el crecimiento del microorganismo patógeno. La estandarización del producto requiere del empleo de este cultivo iniciador para conservar las propiedades organolépticas del producto tradicional y que aseguren la calidad higiénico-sanitaria.

Tabla 4. Valores medios y desviaciones estándar de los análisis físico-químicos realizados a las variantes de chorizo al inicio y al final de la fermentación

Variante	Análisis realizados	inicio	final
1	Humedad (%)	58,98±0,64	30,82±4,22
	Cloruro de sodio (%)	2,71±0,34	4,51±0,27
	Nitrito residual (ppm)	119±1,94	16,41±0,95
	Actividad de agua	0,967 ±0,01	0,86±0,02
	pH	5,89±0,27	5,32±0,04
2	Humedad (%)	59,56±0,32	32,15,±2,28
	Cloruro de sodio (%)	2,62±0,02	4,67±0,35
	Nitrito residual (ppm)	108±2,16	17,60±0,80
	Actividad de agua	0,98 ±0,01	0,85±0,01
	pH	6,15±0,03	5,35±0,07

Var 1.- fórmula patrón. , Var 2.- chorizo con *Salmonella spp* inoculada

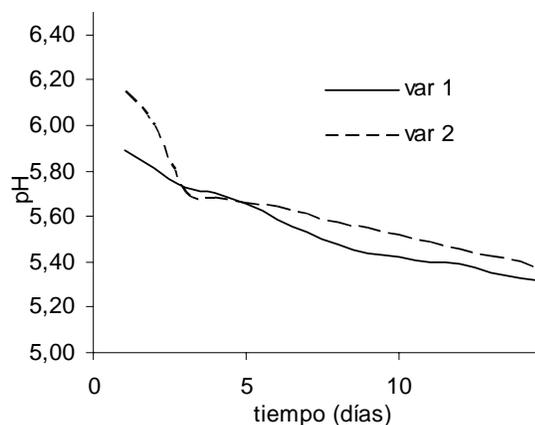


Fig. 2. Valores medios de pH durante el tiempo de fermentación de las variantes 1 y 2.

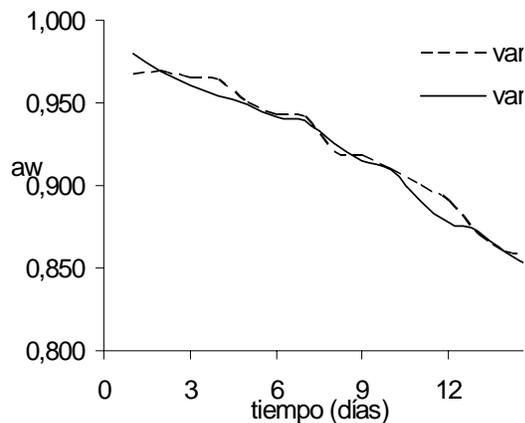


Fig. 3. Valores medios de aw durante el tiempo de fermentación de las variantes 1 y 2.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo señalan a *Lactobacillus acidophilus LA16* como un cultivo bioprotector adecuado para el control de *Salmonella typhimurium* en chorizo elaborado en condiciones artesanales, pues garantiza una disminución paulatina del pH a valores inferiores a 5,5 y una actividad de agua de 0,85.

REFERENCIAS

1. Katikou, P.; Ambrosiadis, I.; Georgantelis, D.; Koidis, P.; Georgakis, S. A.J. *Applied Microb.* 99: 1303-1313, 2005.
2. Lücke, F. *Meat Sci* 56: 105-115, 2000.
3. Budde, B.; Hornbæk, T.; Jacobsen, T.; Barkholt, V. y Koch, A. *Int. J. Food Microbiol.* 83: 171-184, 2003.
4. Mataragas, M.; Drosinos, E.; Metaxopoulos, J. *Food Microbiol.* 20: 259-265, 2003.
5. Vermeiren, L.; Devlieghere, F.; Debevere, J. *Int. J. Food Microbiol.* 96: 149-164, 2004.
6. Fernández, M. y Fragoso, L. *Tecnología Láctea Latinoamericana* 30: 51-54, 2003.
7. Beldarraín, T.; Cepero, Y.; Bruselas, A.; Santos, R.; Ramos, M.; Moya, Y.; Núñez, M.; Vergara, N. *Cienc. Tecnol. Alim.* 18 (2): 8-15, 2008.
8. Beldarraín, T.; Cepero, Y.; Bruselas, A.; Santos, R.; Ramos, M.; Moya, Y.; Núñez, M.; Vergara, N. *Cienc. Tecnol. Alim.* 18 (3): 35-39, 2008.
9. Anón. Catálogo de medios de cultivo. Centro Nacional de Biopreparados, Cuba, 2004.
10. NC-ISO 1442: 2002. *Carne y productos cárnicos. Determinación del contenido de humedad: método de referencia*, Cuba, 2002.
11. NC 357: 2004. *Carne y productos cárnicos. Determinación del contenido de nitrito*, Cuba, 2004.
12. NC-ISO 1841-1: 2004. *Carne y productos cárnicos. Determinación del contenido de cloruro-parte 1: método de Volhard*, Cuba, 2004.
13. NC ISO 2917: 2004. *Carne y productos cárnicos. Medición del pH. Método de referencia*, Cuba, 2004.
14. Krispien, K.; Leistner, L. y Rödel, W. *Fleischwirtschaft* 59 (8): 1173-1177, 1979.
15. Valladares, C.; Roca, M.; Ramos, M.; Ramos, R. y González, E. Efecto del proceso tecnológico sobre la *Salmonella* spp. en productos crudo fermentados tipo español. Monografía. Centro de documentación e información, La Habana, Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia, 1991.
16. Miranda, A. Estudios de embutidos con cultivos iniciadores y ácidos orgánicos. (Tesis entregada en opción al título de Ingeniera Pecuaria. Instituto de Ciencias Agropecuarias de La Habana) 1981, 25 pp.
17. Simonsen, B.; Bryan, F.; Christin, J. y Roberts, T. *Int. J. Food Microbiol.* 76: 227-233, 1987.