



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

Conservación de derivados de carne de ave mediante el uso de antimicrobianos

Preservation of poultry meat derivatives through the use of antimicrobials

Autor/es

Samuel Oliveros Royo

Director/es

Santiago Condón Usón

Facultad de Veterinaria

2022

Resumen

La carne, debido a sus características fisicoquímicas, es un medio de crecimiento óptimo para todo tipo de microorganismos, incluyendo patógenos, por lo que el consumo de carne contaminada puede conducir a la aparición de toxiinfecciones alimentarias. Además de este tipo de microorganismos, la carne es un medio muy adecuado para el crecimiento de microorganismos asociados al deterioro de la carne, y en concreto a la carne de aves, como *Brochothrix thermosphacta*. Debido a la tendencia de consumir alimentos más naturales se está estudiando el efecto que tienen sobre la flora alterante compuestos de origen natural, como los procedentes de aceites esenciales (AEs), de forma que su adición a los alimentos prolongue la vida útil del producto.

En este trabajo se realizó un seguimiento de la flora microbiana de hamburguesas de pollo de la marca Aldelís S.L. (Zaragoza, España) para determinar a partir de qué momento finaliza su vida útil. Simultáneamente se investigó la posibilidad de utilizar marcadores de alteración (pH y nitrógeno básico volátil, NVBT) para indicar de forma temprana la cercanía del fin de la vida útil, además de estudiar el efecto de un antimicrobiano de origen natural (alicina) sobre la flora alterante.

Abstract

Because of its physicochemical characteristics, meat is an optimal growth medium for all types of microorganisms, including pathogens, so the consumption of contaminated meat can lead to serious public health problems. Among the main microorganisms associated with the meat deterioration, and specifically poultry meat, is *Brochothrix thermosphacta*. Due to the tendency to consume more natural foods, has begun a search for antimicrobials of natural origin, such as those from essential oils (EOs).

In this study, the microbial flora of chicken burgers of the brand Aldelís S.L. (Zaragoza, Spain) was monitored to determine from which day their shelf life was lost. Simultaneously, the possibility of using alteration markers (pH and NVBT) to indicate early the closeness of the end of shelf life was investigated. The effect of a natural antimicrobial, allicin, over *B. thermosphacta* was also explored.

Índice

Resumen	1
Abstract	1
Índice	2
1. Introducción	3
1.1.Actualidad de la producción cárnica	3
1.2.Desperdicio alimentario	4
1.3.Flora bacteriana de la carne de ave y derivados	4
1.3.1.Flora alterante	4
1.3.2.Microorganismos patógenos e incidencia de toxiinfecciones	8
1.4.Uso de antimicrobianos en carne	10
1.4.1.Antimicrobianos procedentes de aceites esenciales	11
1.4.2.Alicina	12
2. Justificación y objetivos	14
3. Materiales y métodos	15
3.1.Hamburguesas de carne de ave	15
3.2.Análisis microbiológico	15
3.3.Medios de cultivo	16
3.4.Determinación de indicadores de fin de la vida útil	17
3.4.1.pH	17
3.4.2.Nitrógeno básico volátil total	17
3.5.Ensayos para la evaluación del efecto de la alicina “in vitro”	19
3.6.Modelización matemática del crecimiento microbiano	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
4.1.Evaluación de la evolución de la flora bacteriana en hamburguesas	21
4.1.1.Microorganismos patógenos	21
4.1.2.Flora alterante	21
5. CONCLUSIONES	34
6. Valoración personal	35
7. Bibliografía	36
8. ANEXO	39

1. Introducción

1.1.Actualidad de la producción cárnica

Durante el año 2020, la producción cárnica mundial ascendió hasta la cifra de 337,2 millones de toneladas, siendo niveles similares a la de 2019. No se puede obviar la importancia que ha tomado España a nivel mundial en cuanto a producción y exportaciones de carne. Nos hemos convertido en el principal productor europeo, así como en el principal exportador de la UE, debido a la modernización del sector y la apuesta por la verticalización que han tomado las grandes compañías del sector. Según los datos más actualizados de la FAO en 2018, España es el país de la Unión Europea que dispone de más kilogramos de carne per cápita al año, 98,79kg. (FAO, 2019).

De acuerdo con los datos del Ministerio de Agricultura el sector cárnico en España supuso en 2020 un total de 15.617 millones de euros, representando el 29% de la producción agraria y el 77% de la producción generada por el sector animal. (MAPAMA)

Echando la vista atrás hasta 2012, el crecimiento global del sector ha sido de un 36,8%, siendo las subidas generalizadas en todas las categorías, exceptuando al ovino, equino y carne de conejo que sufrieron disminuciones, siendo las dos últimas las que más bajaron con un 45,7% y un 36,8% respectivamente.

En relación a la producción de porcino, el crecimiento ha sido tal que ha llevado a que actualmente la producción sea prácticamente un 50% superior a la del 2012. En 2021 el 67% de la carne producida en España es de cerdo, lo que conlleva que 2 de cada 3kg de carne producidos en los mataderos españoles, son de cerdo.

La carne con mayor producción es la de porcino, seguida por carne de ave, siendo el pollo el que ocupa un mayor porcentaje. En 2021 la producción de carne de ave alcanzó 1,63 millones de toneladas, sufriendo una bajada del 4,4% con respecto al 2020, debiendo tener en cuenta la reducción del canal HORECA (hostelería, restauración y caterings) y del turismo, que se nutren en gran medida de esta categoría cárnica. Esto, unido al hecho de que a mediados de 2021 se notó un incremento en los costes de producción pudo dar lugar a la bajada en producción en los últimos meses del año. Todavía no hay datos específicos de la categoría para el 2021, pero en 2020, la carne de pollo supuso un 82% del total de la carne de ave, que junto a la de pavo suman el 95% del total.

Según los datos recopilados por la Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España (ANICE) sobre la producción de derivados cárnicos en España, se observa que año tras año la demanda de dichos productos

aumenta, tanto para consumo como para las exportaciones, lo que conlleva un aumento de la producción. En 2021 se alcanzó la cifra de 1.489.500 toneladas, superando a la del 2020 en un 1,6%, siguiendo con la tendencia al alza. La mayoría de la producción se centra en la categoría de tratados por el calor, siendo esta del 31%, siendo estos los de precios más reducidos.

1.2.Desperdicio alimentario

El desperdicio alimentario es uno de los problemas más importantes que afectan al mundo moderno, por lo que se debería tratar como un problema global. Las pérdidas de alimentos aparecen en todas las etapas de la cadena agroalimentaria, desde la producción primaria hasta el consumo, pasando por el almacenamiento, el procesado y la distribución.

Por un lado, se observa una sobreproducción de alimentos, pero por otro lado aumenta el problema del hambre, pese a ser la alimentación una necesidad humana básica. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), se estima que 690 millones (8,9% de la población mundial) sufren hambrunas. La tendencia indica que el número de personas afectadas por el hambre en todo el mundo ha aumentado lentamente desde 2014. En definitiva, para el cumplimiento del Objetivo de Desarrollo Sostenible (ODS) 2 (hambre cero), ligado al ODS 3 (salud y bienestar) y al ODS 12 (producción y consumo responsable) se debe hacer un esfuerzo considerable.

El informe del Índice de Desperdicio de Alimentos de las Naciones Unidas indica que 931 millones de toneladas de alimentos se desperdician en todo el mundo, representando el 17% de los alimentos disponibles para los consumidores en 2019. La mayor parte de estos son alimentos perecederos como la carne, siendo los microorganismos que alteran las características organolépticas la principal causa de dicho desperdicio (FAO, 2021). En este marco, la extensión de la vida útil de la carne de ave y sus derivados cobra especial importancia, ya que se trata de una de las carnes de más consumo y, al mismo tiempo, más perecederas.

1.3.Flora bacteriana de la carne de ave y derivados

1.3.1. Flora alterante

La vida útil de la carne se extiende desde el momento en que un producto alimentario está listo para consumo hasta que se produce un deterioro evidente, que es el momento en el que habitualmente se alcanza una concentración de microorganismos que modifican las características organolépticas hasta un

nivel inaceptable (Borch et al., 1996), pero que no tienen por qué tener necesariamente implicaciones sanitarias. El deterioro de la carne ocurre principalmente por la proliferación de microorganismos, que pueden dar lugar a cambios indeseables en el olor y sabor, así como formación de limo superficial y cambios en el color del alimento (Guerrero-Legarreta, 2014).

La carne de ave es un alimento muy perecedero que se deteriora en 4-10 días tras su sacrificio, incluso en refrigeración (Meredith et al., 2014). Los factores que influyen en el deterioro durante su procesado, distribución y almacenamiento son la carga microbiológica inicial, la temperatura, los componentes del alimento, su actividad de agua y/o su pH (Nychas et al., 2008). Esta problemática se hace incluso más evidente en preparados a base de carne de ave como pueden ser las hamburguesas, ya que el procesado adicional puede añadir flora a la ya existente en la carne, que puede proliferar y acortar todavía más la vida útil de los preparados. El músculo de la carne se considera estéril, y es durante las operaciones de sacrificio, evisceración y envasado cuando esta puede contaminarse. Las principales fuentes de contaminación son la piel y heces de los animales, el ambiente del matadero o la manipulación de canales por parte de los trabajadores (Guerrero-Legarreta, 2014).

1.3.1.1. Indicadores de alteración

El Código Alimentario Español define “alimento alterado” como todo aquel “que durante su obtención, preparación, manipulación, transporte, almacenamiento o tenencia, y por causas no provocadas deliberadamente, sufre variaciones en sus caracteres organolépticos, composición química o valor nutritivo de tal forma que la aptitud para el consumo queda anulada o disminuida, aunque permanezca inocuo”. Como se desprende de la definición, un alimento alterado puede ser inocuo, pero no apto para el consumo (Decreto 2484/1967). Estas variaciones organolépticas son la mayor de las veces resultado del metabolismo de microorganismos alterantes que transforman componentes de la matriz alimentaria en productos volátiles que generan malos olores, a la vez que provocan una acidificación del medio.

Los microorganismos alterantes tienen diversas vías metabólicas y, por consiguiente, tanto el perfil de productos finales como las concentraciones a las que se encuentran son muy variables. Entre ellos, destacan los siguientes: ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, etanol, acetil-metilcarbinol y diacetilo, que producen acidificación del medio, así como olores extraños. Por lo tanto, la determinación del pH puede ser un indicador temprano de alteración microbiana que nos alerte de que la vida útil de nuestro producto está llegando a su fin (Rodríguez, 2017).

Los péptidos y aminoácidos libres son degradados por desaminación y descarboxilación. Entre los productos finales, destacan el amoníaco, sulfuro de hidrógeno, mercaptanos y disulfuros. En carne de ave, el metabolismo de proteínas y péptidos produce los compuestos característicos de la putrefacción, siendo posible determinar el NBVT como indicador de fin de la vida útil de la carne de ave (Rodrigues, 2016).

Cardinal value	<i>B. thermosphacta</i>	Statistics
T_{min}	-3.36 °C	$R^2 = 0.9914$
T_{opt}	27.01 °C	RMSE = 0.02945 °C
T_{max}	30.85 °C	
pH_{opt}	7.11	$R^2 = 0.9882$
pH_{min}	4.79	RMSE = 0.0226 pH unit
$NaCl_{opt}$	0 g l ⁻¹	$R^2 = 0.9941$
$NaCl_{max}$	62.24 g l ⁻¹	RMSE = 0.06177 g l ⁻¹

Figura 1. Parámetros de crecimiento de *B.thermosphacta* (Rodrigues, 2016)

1.3.1.2. *Brochothrix thermosphacta*

Entre los principales microorganismos asociados al deterioro de la carne y, en concreto, la de aves, se encuentra *Brochothrix thermosphacta* (Remenant et al., 2015; Rouger et al., 2017). Se trata de un microorganismo gram positivo, perteneciente a la familia *Listeriaceae*. Es anaerobio facultativo pero su crecimiento en condiciones de aerobiosis acarrea un deterioro del producto ligeramente más rápido que en condiciones de anaerobiosis (Pin et al., 2002). Su temperatura óptima de crecimiento oscila entre 25 °C y 27°C.

Su crecimiento se inhibe a temperaturas superiores de 30,85 °C. El crecimiento, aunque muy débil, continúa por debajo de 0 °C, inhibiéndose a temperaturas inferiores a -3,36 °C (Leroi et al., 2012). Por lo tanto, a temperaturas de refrigeración sigue estando en su rango de crecimiento, pudiendo continuar su proliferación. Su crecimiento viene también determinado por el pH, siendo su pH óptimo de crecimiento 7,11, y se ha observado que en atmósferas modificadas con bajo contenido en oxígeno, su crecimiento se ve inhibido en niveles de pH inferiores a 5,8. *B.thermosphacta* es capaz de soportar concentraciones elevadas de cloruro sódico, de hasta el 6,2 % (Leroi et al., 2012; Dainty y Mackey, 1992). La Figura 1 resume las características fisiológicas de crecimiento de esta especie.

Por otra parte, *B.thermosphacta* es un microorganismo ampliamente distribuido en el ambiente que puede aparecer en diferentes etapas de la cadena alimentaria, sobre todo en las anteriormente nombradas (Nychas et al., 2008).

Las modificaciones organolépticas que *B.thermosphacta* provoca en el alimento dependen en gran medida de la matriz alimentaria. En carne utiliza glucosa como sustrato y produce olores descritos como olor a queso, asociados con la producción de acetoína, diacetilo y 3-metilbutanol (Dainty y Mackey, 1992).

1.3.1.3.Aerobios mesófilos totales

Se trata de un grupo muy heterogéneo. Incluye todas las bacterias que en aerobiosis muestran capacidad para formar colonias visibles a temperatura óptima para los mesófilos (20 °C - 45 °C). El recuento de este grupo estima la flora total, pero sin especificar los microorganismos presentes.

El recuento de este grupo es uno de los indicadores de higiene y calidad alimentaria más usados, ya que categoriza la higiene con la cual se ha tratado el alimento en el proceso industrial, así como en el transporte y almacenamiento. Según el tipo de alimento, la detección de recuentos elevados podría significar que pueden haberse dado condiciones favorables para la multiplicación de microorganismos patógenos para humanos. Consta en el Reglamento (CE) Nº 2073/2005 de la Comisión como criterio de higiene de proceso para la carne picada, siendo $m=5 \times 10^5 \text{ ufc/g}$, $M=5 \times 10^6 \text{ ufc/g}$ ($n=5$; $c=2$), analizando según la norma ISO 4833.

1.3.1.4.Psicrotrofos

Al igual que sucedía con los aerobios mesófilos, los psicrótrofos son un grupo muy heterogéneo. Incluye todas las bacterias que en aerobiosis muestran capacidad para formar colonias visibles a temperaturas inferiores a 15 °C. El recuento de este grupo estima la flora total capaz de crecer a temperaturas de refrigeración, pero sin especificar las especies microbianas presentes.

Dicho recuento es uno de los indicadores de higiene y calidad alimentaria más usados, ya que categoriza la higiene con la cual se ha tratado el alimento en el proceso industrial, así como en el transporte y almacenamiento.

1.3.1.5.Enterobacterias

Las enterobacterias son un grupo de bacterias anaerobias facultativas procedentes del tracto gastrointestinal de los animales y humanos. Son capaces de multiplicarse tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. Su presencia puede indicar tanto contaminación fecal de las canales durante el faenado y manipulación como deficiente limpieza y desinfección de superficies, utensilios y maquinaria.

Dentro de este grupo se incluye *Salmonella spp.*, de frecuente aparición en alimentos destinados a consumo humano. No todas sus cepas son patógenas, pero algunas de ellas, como por ejemplo *S. Enteritidis*, pueden producir cuadros graves de gastroenteritis o diarrea hemorrágica.

1.3.2. Microorganismos patógenos e incidencia de toxiinfecciones

El consumo de carne contaminada por microorganismos productores de toxiinfecciones puede tener graves implicaciones para la salud pública. La carne es un medio de crecimiento muy adecuado para los microorganismos, de los cuales algunos son patógenos (Jay et al., 2005). En Europa la mayoría de los brotes de origen alimentario están asociados al consumo de carne y derivados cárnicos, suponiendo el 21,1 % de los brotes en el año 2019 (EFSA/ECDC, 2021).

Las enfermedades de transmisión alimentaria (ETAs) suponen una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Entre los principales agentes se encuentra *Campylobacter*, siendo la campilobacteriosis la enfermedad transmitida por alimentos con mayor número de casos reportados, suponiendo casi el 70% de los casos (EFSA/ECDC, 2021). Patógenos como *Salmonella spp.*, fueron responsables de 20,0 casos/100.000 habitantes en Europa en el año 2019, con una letalidad del 0,22 %, o *Listeria monocytogenes*, con una incidencia algo menor (0,47 casos/100.000 habitantes en Europa en 2019), pero una tasa de letalidad mucho mayor (17,6%). Estos agentes se encuentran principalmente en alimentos de origen animal como la carne, la leche o los huevos (EFSA/ECDC, 2021). Adicionalmente, es necesario señalar la tendencia al alza de las ETAs en los últimos años, situación fuertemente ligada a la intensificación en las prácticas agrícolas, el estilo de vida de los consumidores, el incremento del consumo de alimentos listos para el consumo (RTE), los cambios demográficos y la globalización del mercado (Chlebicz y Śliżewska, 2018).

1.3.2.1. *Campylobacter*

Campylobacter pertenece al género *Campylobacteriaceae*, un grupo de bacterias presentes en el intestino de animales sanos, siendo su principal reservorio el tracto digestivo de las aves de corral. El género *Campylobacteriaceae* comprende 17 especies y 6 subespecies, de las cuales las detectadas con más frecuencia en ETAs humanas son *C. jejuni* y *C. coli*, siendo la primera la asociada principalmente a aves de corral, mientras que *C. coli* se encuentra sobre todo en el ganado porcino.

Cuando *Campylobacter* pasa a los alimentos se multiplica rápidamente a la temperatura óptima de 37 °C y en ambientes pobres en oxígeno (alimentos envasado al vacío o atmósfera modificada). Se transmite a las personas, principalmente a través del consumo de carne cruda o poco cocinada.

A pesar de que la refrigeración detiene el crecimiento de *Campylobacter*, no lo inactiva. Un tratamiento térmico superior a 65 °C es el más efectivo para eliminar *Campylobacter*, por lo que un tratamiento de cocción sería suficiente para su inactivación en los alimentos.

Es por ello que la mayor incidencia de esta toxiinfección se debe al consumo de alimentos RTE (EFSA/ECDC, 2010), ya que suelen ser conservados en refrigeración y en escasas ocasiones requieren un tratamiento térmico.

1.3.2.2. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes pertenece a la familia *Listeriaceae*. Causa la enfermedad conocida como listeriosis, y su capacidad para sobrevivir en ambientes poco favorables le concede ventajas de cara a su transmisibilidad.

Es un bacilo anaerobio facultativo no formador de esporos y está ampliamente distribuida en el medio ambiente, estando muy presente en el procesado de alimentos. Puede formar biofilms, que le protegen frente a desinfectantes y antimicrobianos, siendo este el motivo por el que es muy difícil de erradicar en establecimientos de fabricación de alimentos.

Aunque lentamente, se multiplica y sobrevive en condiciones de acidez (pH 4-9,6), salinidad, escasez de oxígeno y temperaturas de refrigeración, siendo su temperatura mínima de crecimiento -1,5 °C y su máxima 45 °C. También puede sobrevivir a temperaturas de congelación de -18 °C durante meses.

En los alimentos, *L.monocytogenes* suele ser eliminada mediante la cocción, ya que su termorresistencia es baja, aunque aumenta en condiciones favorables de pH y actividad de agua. No tiene límite microbiológico en el RD 2073/2005.

1.3.2.3. *Salmonella*

Salmonella pertenece a un grupo de bacterias presentes en el intestino de personas y animales sanos, de forma que la contaminación fecal suele ser el principal foco de contaminación de los alimentos. Cuando una persona ingiere un alimento contaminado, le provoca la infección gastrointestinal llamada salmonelosis.

Se han descrito más de 2.500 serotipos de *Salmonella* que muestran una gran adaptación para el crecimiento en el hombre, pero los más importantes desde el punto de vista de la Seguridad Alimentaria

son *Salmonella entérica* serotipo Enteritidis y serotipo Typhimurium. En Europa, el serotipo Enteritidis se ha convertido en el predominante, principalmente asociado al consumo de carne de pollo o huevos contaminados.

Las bacterias *Salmonella spp.* viven en el tracto intestinal de animales sanos, principalmente, aves de corral. *Salmonella* es capaz de multiplicarse en alimentos (carne, huevos, leche) a una velocidad muy elevada, pudiendo duplicar su número cada 15 ó 20 minutos si la temperatura es superior a 20 °C, siendo su temperatura óptima de crecimiento de 35 °C - 43 °C. La temperatura y el tiempo son dos factores claves en el crecimiento de *Salmonella*. Por tanto, los alimentos frescos deben refrigerarse rápidamente para evitar que la bacteria se multiplique (el límite de crecimiento está en 5,2 °C) y contamine los alimentos.

Consta en el RD 2073/2008 como criterio de Seguridad Alimentaria para “Carne picada y preparados de carne a base de carne de aves de corral destinados a ser consumidos cocinados”. El criterio es ausencia en 25g (n=5; c=0), siendo analizado siguiendo la norma EN-ISO 6579.

1.4. Uso de antimicrobianos en carne

El mercado de la carne está en constante renovación, apareciendo cada año distintos tipos de productos. Cada vez hay más tipos de productos y con esta tendencia también mejoran las estrategias de conservación de los mismos. En el caso de la carne de ave fileteada, es práctica común la adición de salmueras con distintos componentes que tienen función antimicrobiana. Dicha salmuera se introduce en la carne por inyección en una máquina inyectora. Tras pasar por dicha máquina las piezas reciben un tratamiento de amasado para distribuir de manera uniforme la salmuera por toda la pieza (Sánchez, 2020).

La finalidad de incorporar ésta salmuera es prolongar la vida útil de la carne al tiempo que se mejoran sus cualidades organolépticas, ya que componentes como la sal y el lactato sódico (componentes mayoritarios de la salmuera) aumentan la capacidad de retención de agua y hacen más tierna la pieza (Alvarado y McKee, 2007).

Está demostrado que la adición de antimicrobianos a los alimentos producen una ralentización del crecimiento microbiano aumentando la vida útil del producto, pero en contraposición muchos de dichos antimicrobianos son de síntesis química y van en contra de la tendencia actual a ingerir productos sin aditivos, que ocasionalmente pueden acarrear consecuencias negativas para la salud (disbiosis intestinales, alergias, generación de resistencias a antibióticos entre poblaciones microbianas, etc.) Es por ello que actualmente se están buscando antimicrobianos de origen natural (normalmente aceites esenciales, AEs)

que no causen estos efectos adversos, al tiempo que tengan una mejor acogida por parte de los consumidores.

En trabajos anteriores realizados por Marín (2021), se consiguió prolongar la fase de latencia mediante la adición de isotiocianato de bencilo a una concentración de 40 ppm a la salmuera, consiguiendo alargar la vida útil hasta más de 4 días con respecto al control, y a concentraciones de 100 ppm, 7 días. Además, se redujo el recuento máximo un ciclo logarítmico aproximadamente, respecto del control.

1.4.1. Antimicrobianos procedentes de aceites esenciales

Los AEs son compuestos procedentes de las plantas que se han utilizado desde la antigüedad para aportar aroma a los alimentos. Sin embargo, a pesar de que este hecho resulta muy atractivo desde el punto de vista culinario, son sus propiedades antimicrobianas las que se busca aprovechar en la industria productora de alimentos. Estas propiedades antimicrobianas podrían ser debidas al mecanismo de defensa natural que tienen las plantas contra ataques externos de microorganismos (Burt, 2004; Mahmoud y Croteau, 2002).

La actividad antimicrobiana de los AEs procede de algunos de los compuestos que los conforman. La cantidad y la proporción de dichos compuestos varía dependiendo de la parte de la planta y época de cosecha (Novak et al., 2006). De ahí surge la necesidad de aislar los componentes de los AEs para poder estandarizar un proceso.

El Reglamento (CE) N° 1334/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre los aromas y determinados ingredientes alimentarios con propiedades aromatizantes utilizados en los alimentos, recoge aquellos compuestos activos permitidos para el uso en alimentos para consumo humano. Se utilizan principalmente como aromatizantes y conservantes de los alimentos. En este Reglamento se incluyen compuestos utilizados en investigaciones previas como el carvacrol, timol, isotiocianato de alilo, isotiocianato de bencilo y citral. Todos ellos pueden ser utilizados sin restricciones de uso. Debido a que la alicina es un antimicrobiano más novedoso y a pesar de aportar un sabor muy agradable, no está incluida en el R 1334/2008, pero al igual que los demás, no posee restricciones de uso.

Con objeto de ilustrar la importancia de la tendencia al incremento de la demanda de antimicrobianos naturales en la industria cárnica, la Figura 2 muestra la evolución del número de publicaciones científicas que relacionan carne y derivados cárnicos con el uso de aceites esenciales como conservantes (Marín, 2021).

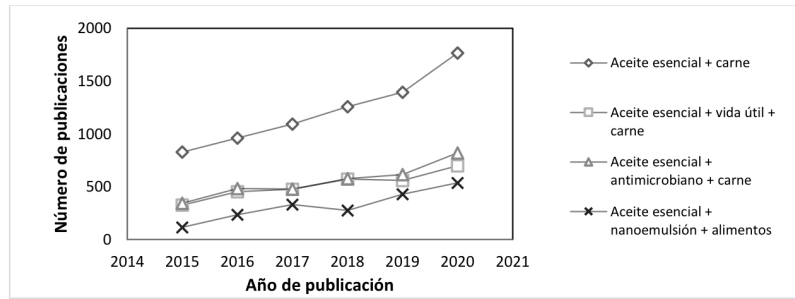


Figura 2. Evolución del número de publicaciones científicas que relacionan carne y derivados cárnicos con el uso de aceites esenciales

1.4.2. Alicina

Entre los productos vegetales de gran interés en la medicina tradicional, el ajo (*Allium sativum* L.) es un producto natural empleado en la prevención y/o el tratamiento de una gran diversidad de enfermedades desde la época de los egipcios, así como utilizado para aderezo en alimentos. Contiene más de 30 compuestos azufrados, pero destaca de entre todos ellos la alicina. La alicina ha ocupado el lugar más destacado por considerarse la sustancia con mayor actividad biológica (Domingo y López-Brea, 2003). Sin embargo, en los últimos años diversos estudios han demostrado que otros tiosulfonatos podrían ser quizás más activos (Alonso, 2007). La formación de tiosulfonatos se produce cuando el ajo se corta o tritura y se activa la enzima aliinasa. Sin embargo, la mayor parte de estos compuestos son altamente inestables y termosensibles, lo que dificulta el estudio de sus propiedades. De la misma manera, la alicina se forma gracias a la acción de la aliinasa, descomponiendo aliína en ácido pirúvico, amoníaco y la propia alicina (Font Quer, 2007).

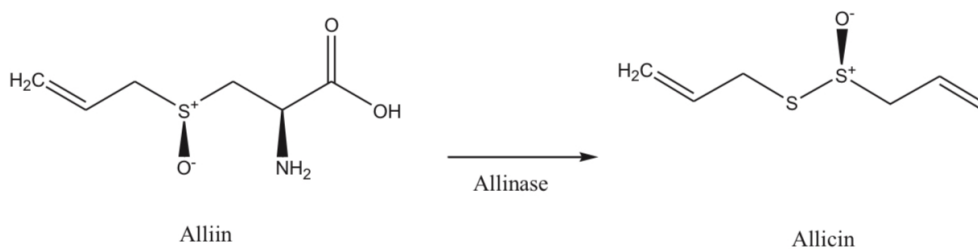


Figura 3. Conversión de la aliína en alicina por la acción de la aliinasa (Miron et al., 2010)

A la alicina se le conoce químicamente como S-Alil-2-propentiosulfonato (IUPAC) y su número CAS es 539-86-6. No se conocen bien los mecanismos químicos que subyacen a la actividad antimicrobiana de la alicina, pero se sabe que altera el aminoácido libre L-cisteína a través de la formación de especies de disulfuro de alilo, alterando el metabolismo microbiano (Miron et al., 2010). La cisteína es una de las moléculas más versátiles en Biología, ya que tiene múltiples funciones, destacando como catalizador y

como regulador de la cadena transportadora de electrones. Tiene una importante función estructural estabilizando proteínas y haciéndolas más resistentes a la proteólisis (Piste et al. 2013).

Ya en 1944, Cavallito y Bailey (1944) llevaron a cabo los primeros ensayos con alicina en bacterias y hongos. Los resultados mostraron que esta sustancia tenía capacidad inhibitoria sobre bacterias gram positivas y negativas. Frente a *Staphylococcus aureus*, por ejemplo, mostraba una capacidad inhibitoria a diluciones de 1/125000 de alicina. Similares dosis se obtuvieron para *Bacillus paratyphosus* y para el *Vibrio cholerae*. El crecimiento de las bacterias se reanudaba a las 18 horas de incubación, por lo que se dedujo que la acción era bacteriostática. La comparación con la mucho más potente penicilina, junto a la inestabilidad intrínseca del producto explicarían el escaso interés por parte de la industria en la producción de alicina. Se sintetizaron derivados de alicina donde el grupo alilo era substituido por grupos alquilo (Small et al., 1947) con propiedades antimicrobianas similares a las de la alicina con la ventaja de ser estables a temperatura ambiente. Sin embargo, tampoco se fabricaron dichos compuestos a escala industrial. Es posible que la situación cambie.

Los estudios sistemáticos sobre la alicina como antimicrobiano han sido sorprendentemente escasos desde aquellas fechas hasta nuestros días. De la bibliografía consultada merece destacarse un estudio sobre los efectos de la alicina sobre la bacteria *Salmonella Typhimurium* por Feldberg y colaboradores (Feldberg et al., 1988). Un descubrimiento significativo fue que la producción de ARN de la bacteria descendió hasta valores por debajo del 1% del valor inicial en los primeros 45 minutos. Luego aumentó hasta alcanzar a las 2 horas los valores normales del control. Los autores sugieren un estudio del efecto de la alicina sobre la enzima ARN polimerasa. En todo caso, no parece probable que la alicina actúe sobre un único proceso bioquímico. Incluso si suponemos que la alicina actúa solamente sobre enzimas con grupos sulfhidrilo, la variedad de estas enzimas en las bacterias y su total o parcial inactivación provocaría el bloqueo de varios procesos bioquímicos.

A pesar de la inestabilidad citada, la alicina presenta ventajas sobre otros antimicrobianos que hacen que su estudio merezca la atención de diversas investigaciones. Una ventaja es su baja toxicidad. (LD50 de 60 mg/kg en ratón) (Cavallito y Bailey, 1944) y su facilidad de eliminación por la respiración o el sudor. También presenta una gran capacidad de difusión a través de membranas lipídicas (Rabinkov et al., 1998; Miron et al., 2000). Además, aunque es bacteriostático, no existen indicios de mecanismos de resistencia frente a la alicina como sucede con otros antimicrobianos. La acción combinada de la alicina con otras sustancias con efectos similares es un campo poco conocido pero con interesantes posibilidades.

2. Justificación y objetivos

La necesidad de prolongar la vida útil de alimentos perecederos como la carne de ave, acompañado del interés creciente de los consumidores de comprar alimentos con menor cantidad de aditivos químicos, exige la renovación de la industria alimentaria, haciendo que se busquen alternativas a las estrategias de conservación empleadas hasta el momento.

El objetivo general de este Trabajo de Fin de Grado fue estudiar la vida útil de hamburguesas de pollo, evaluando el impacto de *B.thermosphacta* sobre su alteración y la eficacia antimicrobiana de la alicina frente a dicho microorganismo. Para lograr este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- Evaluar la evolución de la flora microbiana en hamburguesas de pollo durante su vida útil.
- Evaluar la influencia de la atmósfera protectora en la vida útil de las hamburguesas.
- Evaluar la influencia de sulfitos en la vida útil de las hamburguesas.
- Evaluar la eficacia de la alicina sobre *B. thermosphacta*.
- Evaluar las interacciones entre la alicina y el lactato de sodio sobre el crecimiento de *B.thermosphacta*.
- Evaluar las interacciones entre la alicina, el vinagre y la sal sobre el crecimiento de *B.thermosphacta*.
- Evaluar la influencia de la temperatura sobre la eficacia de la alicina.

3. Materiales y métodos

3.1. Hamburguesas de carne de ave

Para el estudio de la evolución de la flora microbiana en hamburguesas de ave se utilizaron hamburguesas de pollo de la empresa Aldelís S.L., que se trasladaron a las instalaciones de la Facultad de Veterinaria y se congelaron a -20 °C. Las hamburguesas estaban separadas en dos lotes, uno de los cuales incorporaba sulfitos como aditivo, y ambos lotes estaban envasados en atmósfera protectora con 20% CO₂. El lote con sulfitos estaba envasado en lotes de 8 y el lote sin sulfitos por parejas; ambos estaban envasados en bandejas de polietileno (PET).

Con el fin de hacer un estudio de vida útil se fueron extrayendo hamburguesas de la cámara de congelación “over night” a 5 °C ± 1 °C cada dos días, teniendo así muestras correspondientes a los días 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 en refrigeración.

3.2. Análisis microbiológico

Se analizaron los grupos microbianos mesófilos totales, psicrótrofos, *Enterobacteriaceae* y *Brochothrix thermosphacta* como indicadores de higiene de proceso y alterantes, y *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes* y *Campylobacter spp.* como indicadores de salubridad.

Para obtener las muestras se tomaron 25 gramos de hamburguesa de pollo asépticamente con unas tijeras y unas pinzas y se transfirieron a una bolsa de Stomacher (VWR®, Pensilvania, EEUU), que contenía 225ml de agua de peptona tamponada (0,1%) (Oxoid LTD, Basingstoke, Inglaterra). Se homogeneizó la muestra con el Stomacher (STOMACHER® 400C, COLE-PARMER®, Illinois, EEUU) durante 5 minutos a 230 rpm a temperatura ambiente. Para las siembras de los microorganismos se realizaron diluciones en serie con el objetivo de obtener concentraciones de microorganismos que permitiesen el recuento correcto en placas de Petri de 90mm. Dichas diluciones se hicieron pipeteando 100 µL de la dilución anterior previamente pasada por un rotatubos (Genius 3, IKA®, Staufen, Alemania) en 900 µL de agua de peptona tamponada.

Las diluciones de cada muestra se planificaron basándonos en los recuentos realizados en investigaciones previas (Marín, 2021), relativos a pechugas enteras salmuerizadas de pollo. Se sembraron dos diluciones de cada muestra, y todas ellas por duplicado. El seguimiento de *Salmonella*, *Listeria* y *Campylobacter* se hizo

solamente los días 0, 8 y 16, ya que se esperaba ausencia en los referentes a seguridad alimentaria. Es por eso que las diluciones planificadas quedaron como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Diluciones planteadas para cada día y grupo microbiano

	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10	Día 12	Día 14	Día 16
Mesófilos totales	-2, -4	-2, -4	-2, -4	-4, -6	-4, -6	-4, -6	-4, -6	-4, -6	-4, -6
Psicrótrofos	-2, -4	-2, -4	-2, -4	-4, -6	-4, -6	-4, -6	-4, -6	-4, -6	-4, -6
Enterobacterias	-2, -4	-2, -4	-2, -4	-4, -6	-4, -6	-4, -6	-4, -6	-4, -6	-4, -6
B.thermosphacta	-2, -4	-2, -4	-2, -4	-4, -6	-4, -6	-4, -6	-4, -6	-4, -6	-4, -6
Salmonella	-2				-2				-2
L.monocytogenes	-2				-2				-2
Campylobacter	-2				-2				-2

3.3. Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo utilizados para esta investigación, a excepción del empleado para el estudio de *Salmonella*, fueron de la marca Oxoid (Oxoid LTD).

Para el recuento de mesófilos totales se utilizó Agar Triptona Soja (TSA) suplementado con 0,6 % de extracto de levadura (TSA-EL) y una incubación de 24 horas a 35 °C. También se utilizó este medio para los psicrótrofos, dejándolos incubar 7 días a 7 °C. Ambos se sembraron mediante la técnica de homogeneización en masa.

Brochothrix thermosphacta se determinó con agar STAA (Oxoid LTD) después de la incubación durante 48h horas a 25 °C. A este medio se le añadió el suplemento selectivo SR0151E y 7,5g de glicerol cada 100ml.

Para las enterobacterias se utilizó agar VRBG (Oxoid LTD), sembrando en masa añadiendo una doble capa de agar tras la siembra para crear condiciones de microaerofilia. Se incubaron durante 24h a 35 °C.

Para la determinación de *Salmonella* se utilizó agar BPLS (Merck KGaA), incubado durante 24h a 35 °C. Éste agar vira de color con el cambio del pH, indicando acidificación del medio. Las colonias de *Salmonella* se ven de color rojo. Se sembró mediante la técnica de homogeneización en masa.

Listeria monocytogenes se sembró en masa en agar cromogénico para listeria (OCLA) al que se le añadieron los suplementos selectivos SR0226E y SR0228E. Se incubaron durante 48h a 10 °C.

Para *Campylobacter spp.* se utilizó agar CDFSA (Oxoid LTD) suplementado con SR155E, incubándose durante 24h a 35 °C en condiciones de anaerobiosis. Se sembró mediante la técnica de homogeneización en masa.

En la Tabla 2 se muestran los grupos microbianos estudiados con sus respectivos medios y condiciones de cultivo. Las normas ISO utilizadas se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2: Medios de cultivo y condiciones de incubación para cada grupo microbiano

Grupo microbiano	Medio de cultivo	Temperatura de cultivo (°C)	Tiempo de incubación (días)	Condiciones especiales	Norma ISO
Mesófilos totales	Tryptone Soya Agar (Oxoid) + Yeast extract (Oxoid) (0,6%)	35	1	X	UNE-EN ISO 4833
Psicrótrofos	Tryptone Soya Agar (Oxoid) + Yeast extract (Oxoid) (0,6%)	7	7	X	UNE-EN ISO 4833
Enterobacterias	Violet Red Bile Glucose Agar (Oxoid)	35	1	X	UNE-EN ISO 21528
<i>B. thermosphacta</i>	STAA Agar Base (Oxoid)	25	2	X	
<i>Salmonella</i>	Brilliant-green Phenol-red Lactose Sucrose Agar (Merck KGaA)	35	1	X	UNE-EN ISO 6579
<i>L. monocytogenes</i>	Chromogenic listeria Agar (Oxoid)	10	1	X	UNE-EN ISO 11290
<i>Campylobacter</i>	CDFSA	40	1	Anaerobiosis	EN-ISO 10.272-2

3.4.Determinación de indicadores de fin de la vida útil

3.4.1.pH

Para determinar el pH, y probar su utilidad como indicador del crecimiento microbiano y final de la vida útil, se prepararon las muestras en el Stomacher y se midió con un pHmetro (pH-Meter BASIC 20+, Crison, Barcelona, España).

3.4.2.Nitrógeno básico volátil total

Las bases nitrogenadas volátiles se extraen de la muestra mediante una solución acuosa de ácido perclórico al 6% (v/v). Una vez alcalinizado, el extracto se somete a destilación al vapor y los componentes básicos volátiles se absorben mediante un receptor ácido. La concentración de NBVT se determina mediante titulación de las bases absorbidas (RD 2074/2005). La destilación directa descrita por Antonacopoulos

(Antonacopoulos, 1960) es el método de referencia para determinación de NBVT en productos de la pesca (RD 2074/2005).

Para nuestras determinaciones se pesaron 2 g de muestra y se traspasaron a un tubo falcon de 50ml que contenía la disolución de ácido perclórico al 6%. Se trituró la muestra en el tubo falcon con un ultraturrax (Ultra-Turrax T25 digital, IKA®, Staufen, Alemania) hasta que quedó homogéneo y se centrifugó en la centrífuga (Megafuge 1.0 R, Heraeus, Hanau, Alemania), previamente atemperada a 4 °C, a 3000 rpm durante 5 min.

Tras centrifugar se filtró el sobrenadante y se desecharon los restos sólidos. El sobrenadante se traspasó a un tubo de destilación junto a 3 gotas de fenoftaleína. Una vez preparado el tubo de muestra, se puso en el destilador (Kjelsahl UDK 149, Cromakit, Granada, España), que realizó una destilación automática con una disolución de hidróxido potásico 5% (m/v). Una vez hecha la destilación y recuperados los volátiles en un erlenmeyer con 20mL de ácido bórico 3% (m/v) y 3 gotas de tachiro, se realizó la valoración.

La valoración se realizó con un pHmetro (AE150, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EEUU) automático que añadía ácido clorhídrico 0,1N hasta el final de la valoración. Previamente se había preparado un blanco sin añadir los 2 g de muestra.

La concentración de NBVT, expresada en mg/100g de muestra, se calculó con la Ecuación 3:

$$NBVT = \frac{(V1 - V0) \times 0,1 \times 14 \times 100}{M}$$

Ecuación 1. Cálculo de la concentración de NBVT en 100g de muestra

Siendo:

V1 = Volumen en ml de solución de ácido clorhídrico 0,01 mol por muestra

V0 = Volumen en ml de solución de ácido clorhídrico 0,01 mol por muestra en blanco

M = Peso de la muestra en g.

3.5. Ensayos para la evaluación del efecto de la alicina “in vitro”

Para el estudio de la actividad antimicrobiana de la alicina frente a *B. thermosphacta* se utilizó un cocktail de 4 cepas aisladas en anteriores investigaciones de carne de ave alterada procedente de la empresa Aldelís S.L., y conservadas en crioviales a -80 °C en una solución de glicerol al 20 % (Marín, 2021).

Durante toda la investigación se mantuvieron los cultivos frescos sembrando semanalmente estrías por agotamiento. Las siembras se realizaron en agar TSA con 0,6 % (p/v) de extracto de levadura (TSA-EL). Tras la siembra las placas se incubaron a 25 °C durante 24 horas, y posteriormente se conservaron a 7 °C ± 1 °C hasta la siguiente semana.

Para la preparación de las suspensiones se realizaron precultivos por separado de cada una de las 4 cepas a estudiar, inoculando una colonia de la placa de mantenimiento con la morfología típica de *B. thermosphacta* en un tubo de ensayo con Caldo Triptona Soja (TSB, Oxoid LTD) suplementado con 0,6 % de EL (TSB-EL). Los tubos fueron incubados durante 24 horas a 25 °C en agitación.

A partir de cada precultivo se inocularon 10 µL en botes con 10 mL de TSB-EL. Los botes se incubaron en agitación y aerobiosis durante 24 horas a 25 °C. Tras la incubación, y una vez alcanzada la fase estacionaria, se obtuvieron concentraciones de *B. thermosphacta* de aproximadamente 10⁹ ufc/mL, en las 4 cepas.

Para la preparación de la suspensión de trabajo, se añadió 1 mL de cada una de las suspensiones a un tubo Falcon estéril, y se homogeneizó utilizando un rotatubos. A partir del tubo Falcon se realizaron diluciones en agua de peptona, con el fin de conseguir una concentración aproximada de 10⁴ ufc/placa.

Para estudiar el efecto de la alicina se localizó la zona de concentraciones efectivas mediante un rastreo con distintas concentraciones para así poder cuantificar mejor su acción antimicrobiana. Para el estudio se utilizó la técnica de siembra en masa. Para ello, se depositaron en la placa 100 µL de una mezcla de las 4 cepas, previamente diluida para garantizar una concentración de 10⁴ UFC/placa. Posteriormente se inocularon 100 µL de la disolución de alicina (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EEUU) de la concentración a estudiar en una zona distinta de la placa, se rellenó la misma con agar TSA-EL y se homogeneizó el contenido. Las placas se incubaron a 25 °C durante 10 días. El seguimiento de los recuentos se realizó los días 0, 1, 2, 3, 5, 7 y 10, contando las placas con un contador automático de colonias por análisis de imagen, diseñado por nuestro grupo de investigación y construido por los servicios centrales de UNIZAR.

3.6. Modelización matemática del crecimiento microbiano

La evolución del crecimiento de los microorganismos, fue representada mediante el logaritmo de los recuentos microbianos frente al tiempo de incubación. Las curvas se modelizaron con una hoja de cálculo de Microsoft Office Excel (Microsoft Co., Redmond, Washintong, EEUU), construida al efecto con la ecuación de Gompertz (Ecuación 1), que permite describir las curvas de crecimiento (Gibson et al., 1988).

$$L(t) = A + Ce^{-e^{-B(t-M)}}$$

Ecuación 2. Ecuación de Gompertz (Gibson et al., 1988)

Siendo:

$L(t)$ = logaritmo decimal del recuento en el tiempo t (log UFC/mL)

A = logaritmo decimal del recuento inicial (log UFC/mL)

C = logaritmo decimal del incremento en el recuento bacteriano (log UFC/mL)

M = tiempo en el cual el cultivo alcanza su máxima velocidad de crecimiento (horas)

B = velocidad de crecimiento relativo en el punto M (horas⁻¹)

t = tiempo (horas)

La Figura 4 muestra un esquema de la curva de crecimiento microbiano, y los parámetros que la describen:

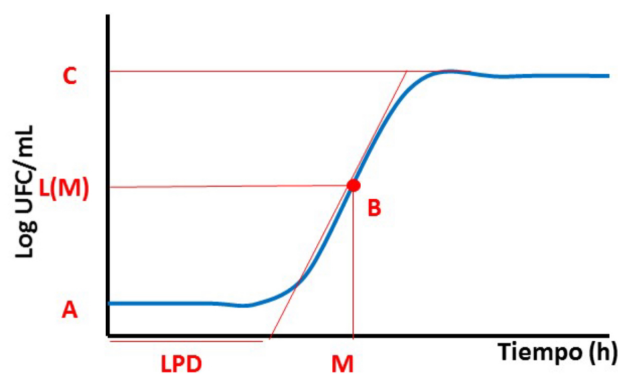


Figura 4. Representación gráfica de una curva de crecimiento microbiano según el modelo de Gompertz (Gibson et al., 1988).

Para interpretar los resultados, se calculó la desviación estándar (σ) a partir de la Ecuación 3.

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum (x - \mu)^2}$$

Ecuación 3. Desviación estándar

Siendo:

σ = desviación estándar de una población

N = tamaño de la población

μ = media de los valores de la población

Con objeto de interpretar y comparar los resultados, se ajustaron las curvas de crecimiento microbiano a este modelo matemático utilizando la herramienta Solver de Microsoft Office Excel® 2016 (Microsoft Co., Redmond, Washington, U.S.A) mediante un ajuste de mínimos cuadrados.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Evaluación de la evolución de la flora bacteriana en hamburguesas

4.1.1. Microorganismos patógenos

Salmonella no fue detectada en ninguna muestra, tal y como se esperaba. Únicamente se detectó en una muestra del día 2 (Atm 1), pero al no detectarse en ninguna muestra siguiente se achacó dicho resultado a una contaminación de la muestra. La legislación exige la no detección de *Salmonella* en 25 g, por lo que no sorprenden estos resultados y corroboran que la empresa se ajusta a la legislación en cuanto a este aspecto.

Con respecto a *L.monocytogenes* y *Campylobacter*, tampoco fueron detectadas en ninguna muestra a lo largo de los días del experimento.

Estos resultados indican que la seguridad alimentaria de éstas hamburguesas es correcta.

4.1.2. Flora alterante

En este apartado se comenta la evolución de la flora alterante por grupos microbianos, y la influencia de las tecnologías actuales de conservación. Para la comparación se usan las gráficas de crecimiento obtenidas y

los parámetros que las definen, provenientes de la ecuación de Gompertz, obtenidos a partir de la modelización con Solver en Excel.

Debido a dificultades para el desarrollo de los recuentos del día 16 se han eliminado del análisis.

Los parámetros de crecimiento resultantes de la modelización se representan en la Tabla I del Anexo.

4.1.2.1. Evolución mesófilos

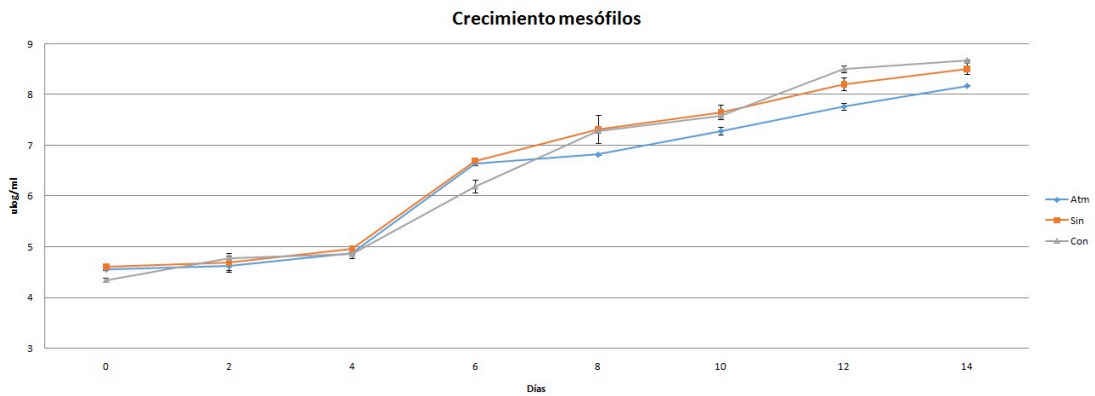


Figura 5. Curvas de crecimiento de aerobios mesófilos totales en hamburguesas de pollo

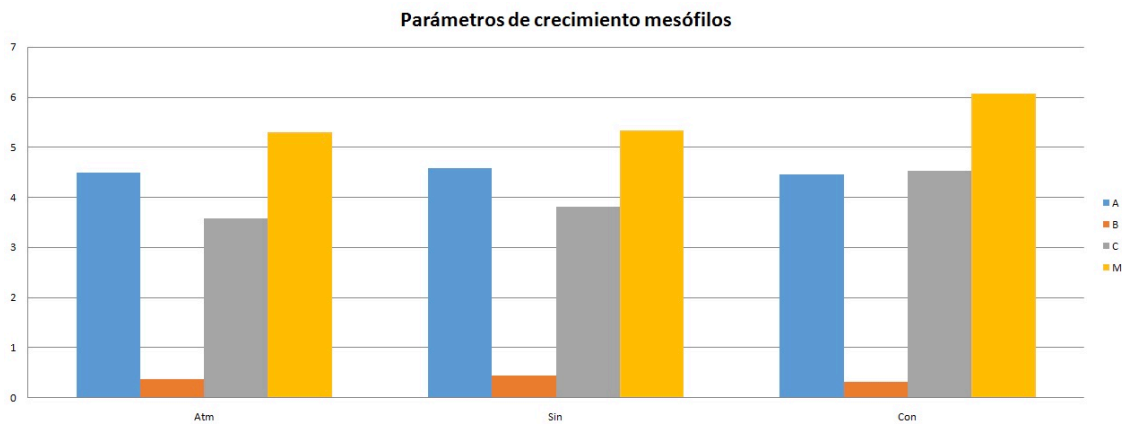


Figura 6. Parámetros de crecimiento de aerobios mesófilos totales en hamburguesas de pollo

Como se puede ver en las Figuras 5 y 6, el recuento de los mesófilos totales comienza en el día 0, en las tres muestras, entorno a las 4,5 unidades logarítmicas (ulog) y alcanza en el día 14 recuentos de 8,17 unidades logarítmicas en la muestra de atmósfera modificada (Atm), 8,51 ulog en la muestra sin sulfitos (Sin) y 8,67 ulog en la muestra con sulfitos (Con).

En la Figura 5 se observa que hay una fase de latencia hasta el día 4, y la fase de crecimiento es muy rápida hasta el día 6 y más lenta posteriormente.

En la curva de recuentos (Fig. 5) se observa también que la atmósfera modificada tiene efecto en el recuento máximo de mesófilos. El detalle de los parámetros de crecimiento se puede observar con mayor claridad en la Figura 6. Como se observa en la figura el valor M es ligeramente superior en la muestra enriquecida con sulfitos, pero las diferencias no son significativas.

Se observa que sobre los mesófilos totales, la atmósfera modificada tiene una ligera influencia sobre el recuento final, pero no modifica la fase de latencia ni el valor de velocidad máxima de crecimiento. Los sulfitos no parecen tener efecto significativo sobre el crecimiento.

4.1.2.2. Evolución psicrótrofos

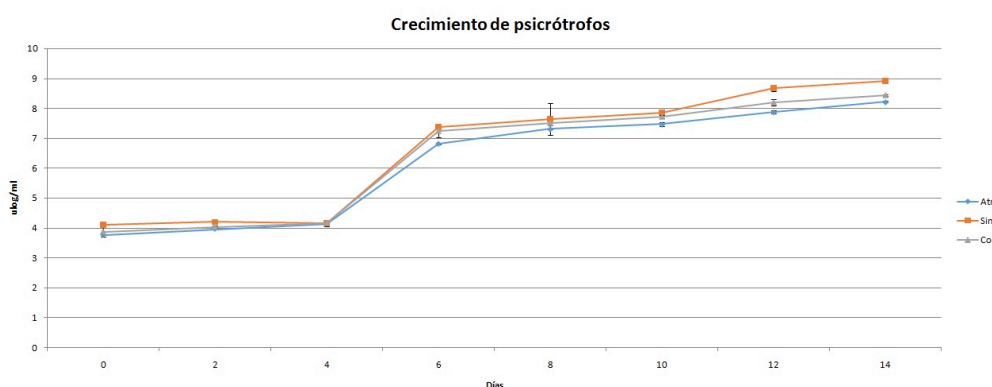


Figura 7. Curvas de crecimiento de psicrótrofos en hamburguesa de pollo

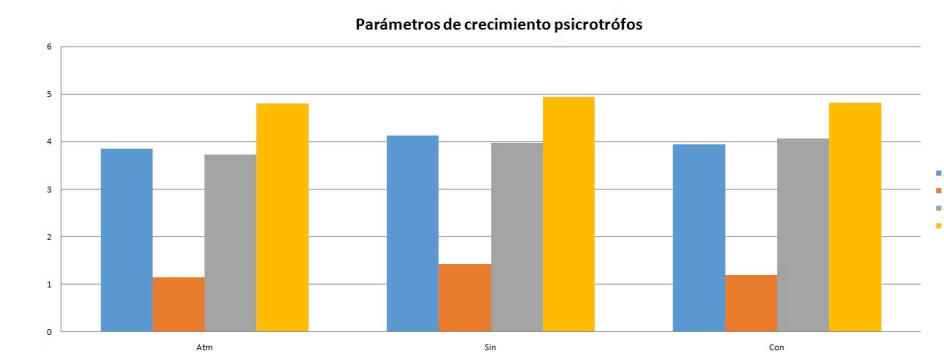


Figura 8. Parámetros de crecimiento de psicrótrofos en hamburguesa de pollo

Con respecto a los psicrótrofos, se observan parámetros de crecimiento similares al grupo de los mesófilos, teniendo recuentos iniciales ligeramente inferiores.

En este caso encontramos recuentos iniciales inferiores, con respecto al grupo anterior, y se alcanza antes la máxima velocidad de crecimiento. La fase de latencia vuelve a observarse hasta el día 4.

Se vuelve a observar la influencia de la atmósfera sobre el crecimiento provocando disminución en el recuento final, pero no alterando los otros parámetros de crecimiento, como la fase de latencia ni la velocidad de crecimiento (Figura 8.).

Del mismo modo también se observa que la adición de sulfitos no conlleva ningún cambio en cuanto a los parámetros de crecimiento (Figura 8).

4.1.2.3. Evolución de las enterobacterias

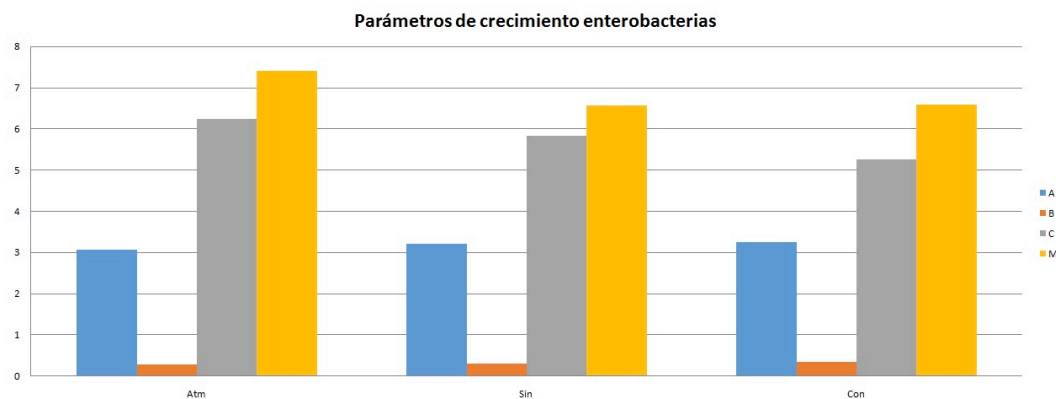


Figura 9. Parámetros de crecimiento de enterobacterias en hamburguesa de pollo

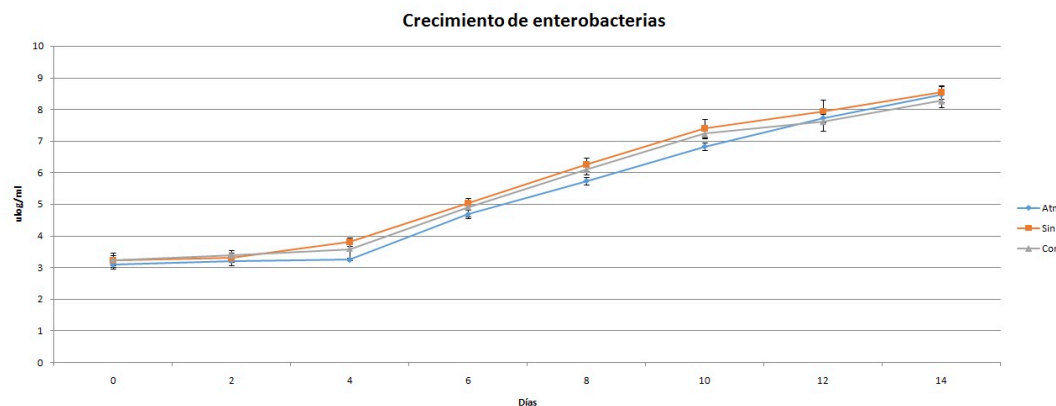


Figura 10. Curvas de crecimiento de enterobacterias en hamburguesa de pollo

En el crecimiento de las enterobacterias vuelve a observarse una fase de latencia hasta el día 4, y el día 10 parece iniciarse la fase de latencia (Figura 10).

El recuento inicial de este grupo es muy inferior al de totales, superando por muy poco las 3 ulog, y situando el recuento final entorno a las 8 ulog. Debido a este recuento inicial tan bajo es el grupo microbiano de los estudiados con mayor crecimiento, obteniendo los mayores valores C. Pese a esto, el crecimiento es más lento, obteniendo los valores más bajos respecto al resto de grupos estudiados (Figura 9).

En este grupo no se observan diferencias significativas en cuanto al uso de atmósfera protectora y sulfitos.

4.1.2.4. Evolución *Brochothrix thermosphacta*

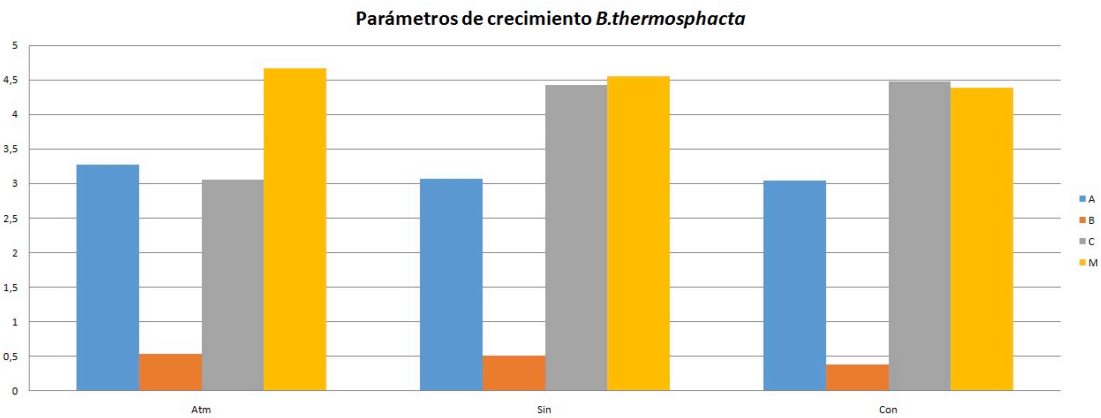


Figura 11. Parámetros de crecimiento de *B.thermosphacta* en hamburguesa de pollo

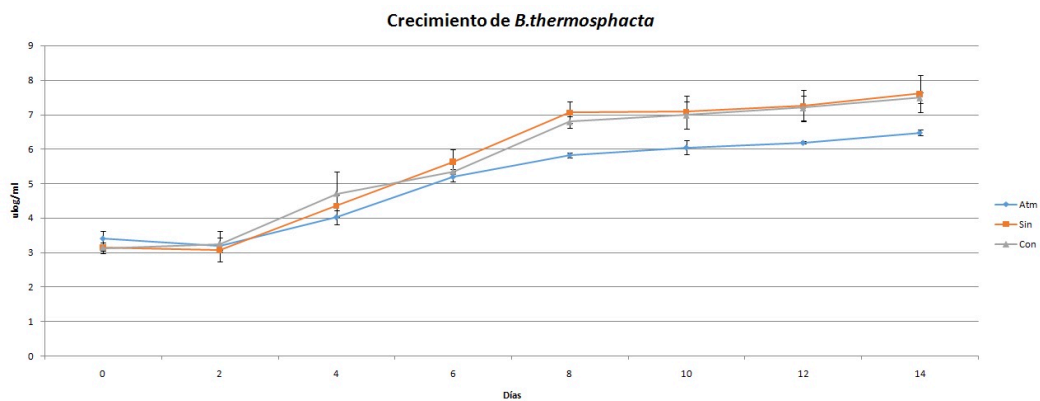


Figura 12. Representación de los parámetros de crecimiento de *B.thermosphacta* en hamburguesa de pollo

Al igual que las enterobacterias, en *B. thermosphacta* se observa un recuento inicial inferior, entorno a las 3 ulog y un recuento final igualmente inferior, en torno a 7,5 ulog en las muestras Sin sulfitos y Con sulfitos, y 6,47 ulog en la muestra sin sulfitos y con atmósfera modificadas.

La fase de latencia se observa más corta en este microorganismo acabando el día 2, y la fase estacionaria comienza el día 8 con el fin de la fase de crecimiento exponencial.

Es en este microorganismo donde se aprecia el efecto de la atmósfera modificada en la evolución de los recuentos, ya que se reduce el recuento final 1 ulog con respecto al control (Sin sulfitos) y con respecto a la muestra enriquecida con sulfitos (Con). Los sulfitos no muestran ningún efecto bacteriostático sobre esta especie.

Al igual que en el caso de los mesófilos y psicrótrofos, la atmósfera modificada consigue reducir el recuento final de *B. thermosphacta*, pero no tiene función bacteriostática, ya que no se observa un aumento de la fase de latencia.

Un aumento de la fase de latencia conlleva un aumento de la vida útil, por lo que el uso de antimicrobianos en sinergia con la atmósfera modificada podría ser una buena estrategia de cara a aumentar la vida útil. Debido a que *B. thermosphacta* es el principal microorganismo causante de la alteración de la carne (Nychas et al., 2008), se decidió estudiar el efecto de la alicina en el crecimiento de *B. thermosphacta* debido a su origen natural, su adecuación organoléptica con la hamburguesa y por su potente efecto antimicrobiano.

4.1.3. pH y NBVT como indicadores de alteración

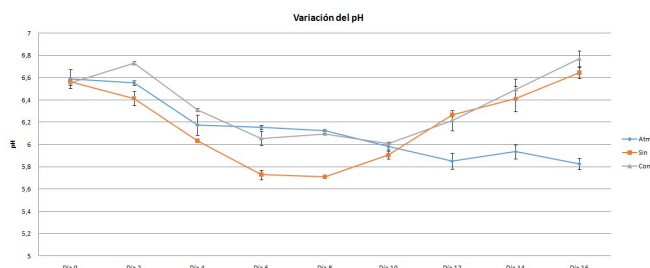


Figura 13. Evolución del pH en hamburguesas de pollo

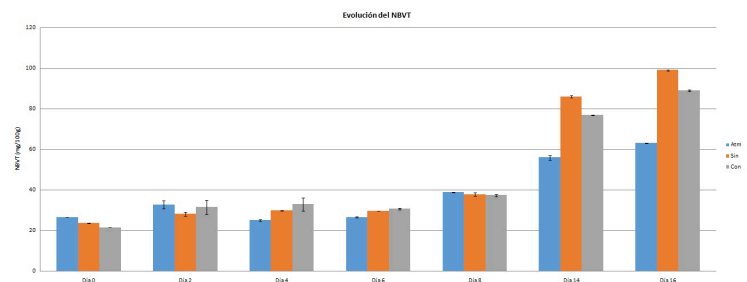


Figura 14. Evolución del NBVT en hamburguesas de pollo

A partir del día 8, el olor de las hamburguesas comenzó a ser indeseable, indicador de mal estado de las hamburguesas. Coincide dicho día con un punto de inflexión en el pH y el NBVT. Inicialmente, el pH desciende en las tres muestras y continúa disminuyendo en la muestra conservada en atmósfera protectora. Por el contrario, en las muestras con sulfitos y en el control aumentó a partir del día 10 y 8 respectivamente.

A su vez, el NBVT aumentó de forma similar en las tres muestras hasta el día 8, y siguió con la misma tendencia en la muestra conservada en atmósfera protectora. En el caso de las muestras con sulfitos y la control, el NBVT se disparó a partir de ese día, coincidiendo con el aumento del pH.

El aumento del pH puede ser debido a la descomposición proteica, en relación con los valores de NBVT que consiguen alcalinizar el medio. Por el contrario, la muestra almacenada con atmósfera protectora que no registra aumento en el pH, tampoco registra un aumento tan grande de NBVT como las otras dos muestras.

A partir del día 8 es cuando comenzó a aparecer el mal olor indicador de mal estado de las hamburguesas, y es ese mismo día cuando el pH comienza a ascender en las muestras con sulfitos y sin atmósfera protectora y el día a partir del cual se dispara el NBVT. Debido a que anteriormente no se registran grandes variaciones de pH y NBVT con respecto al inicio de la vida útil, se saca la conclusión de que el pH y el NBVT son valores que no pueden ser utilizados para la indicación temprana del fin de la vida útil.

4.2. Estudio del efecto de la alicina sobre *Brochothrix thermosphacta*

En este apartado se describe el efecto de la alicina, sola o en combinación con otros compuestos, sobre el crecimiento de *B. thermosphacta* incubado a 25 °C. Para el análisis de los datos se analizaron las curvas de recuento, utilizando los parámetros que definen las curvas de crecimiento, provenientes de la ecuación de Gompertz, obtenidos a partir de la modelización con Solver en Excel. Los parámetros de crecimiento resultantes de la modelización se representan en la Tabla 3 en el Anexo.

4.2.1. Evaluación "in vitro" de las concentraciones efectivas de alicina

Para determinar el rango de concentraciones de alicina efectivas frente a *B. thermosphacta* se estudió el efecto sobre el crecimiento de las siguientes concentraciones: 0 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 12 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL y 50 µg/mL. Los resultados obtenidos pueden observarse en la Figura 15.

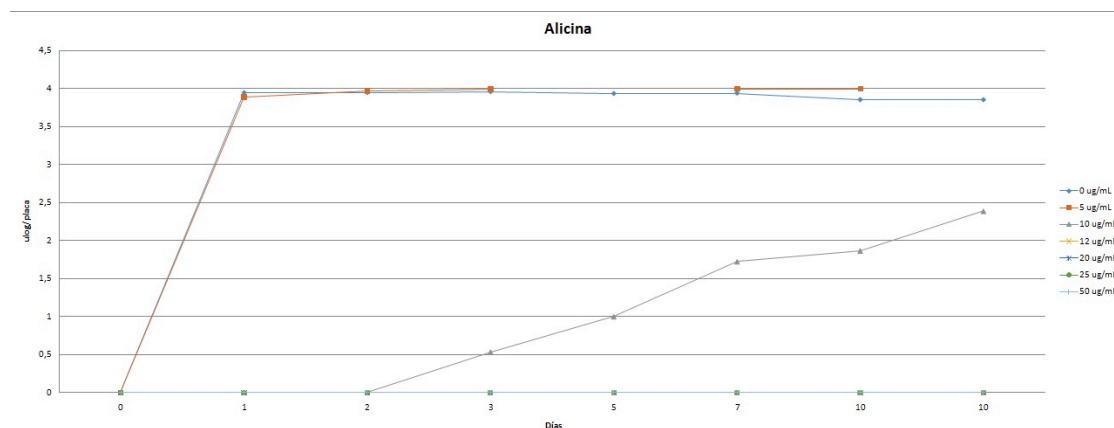


Figura 15. Influencia de distintas concentraciones de alicina sobre el crecimiento de *B. thermosphacta*

Como se observa en la Figura 15, el uso de 5 µg/mL de alicina no tiene ningún efecto sobre el crecimiento, sin embargo, en la muestra con 10 µg/mL se observa que la alicina es capaz de aumentar un día la fase de latencia, además de disminuir la velocidad de crecimiento alargando de esta manera la fase de crecimiento

exponencial. A su vez consigue reducir la velocidad de crecimiento, lo que demuestra un efecto bacteriostático importante. Con concentraciones de 12 $\mu\text{g/mL}$ y superiores, se inhibe por completo el crecimiento, lo que implica un efecto bactericida importante.

4.2.2. Estudio "in vitro" de la influencia de la temperatura sobre el efecto de la alicina frente al crecimiento de *B. thermosphacta*

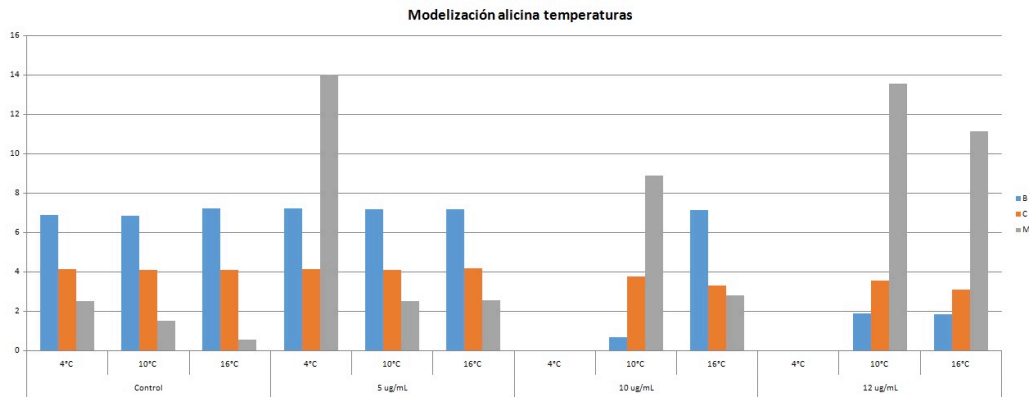


Figura 16. Parámetros de crecimiento de *B. thermosphacta* a distintas temperaturas con distintas concentraciones de alicina

El estudio de la influencia de la temperatura sobre el efecto de la alicina frente a *B. thermosphacta* se realizó con tres temperaturas distintas: 4 °C, 10 °C y 16 °C, obteniendo los crecimientos que se representan en las Figuras 17, 18, 19 y 20. Se modelizaron estos crecimientos con la ecuación de Gompertz y se obtuvieron los resultados expresados en la Figura 16.

En el control (Figura 17) se observa que la temperatura alarga la fase de latencia, siendo de 2, 1 y 0 días para 4 °C, 10 °C y 16 °C respectivamente. La temperatura no afectó de forma importante al resto de parámetros, ya que se obtuvieron los mismos valores de B, C y M para las 3 temperaturas.

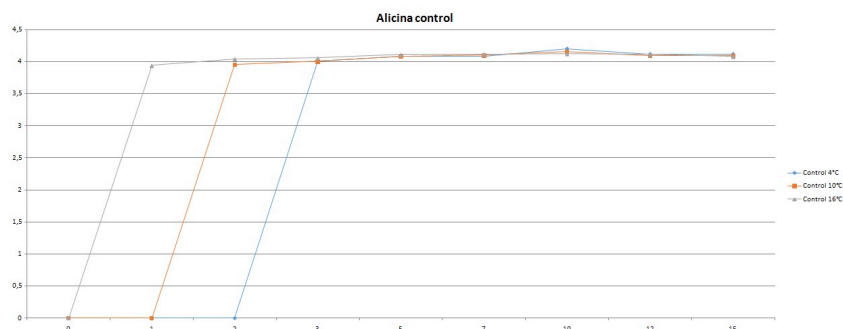


Figura 17. Representación del crecimiento de *B. thermosphacta* a distintas temperaturas

Incluso con la concentración más baja de alicina testada (5 µg/mL) se observó un aumento de la fase de latencia para todas las temperaturas, como se puede observar en la Figura 18. La fase de latencia se alargó hasta el día 12 a 4 °C, y hasta el día 2 a 10 °C y 16 °C.

La siembra estaba estandarizada para garantizar una concentración de 4 ulog/placa, por lo que esta concentración de alicina no influyó en el recuento final a ninguna temperatura deduciendo que la alicina solo manifiesta un efecto bacteriostático a esta concentración.

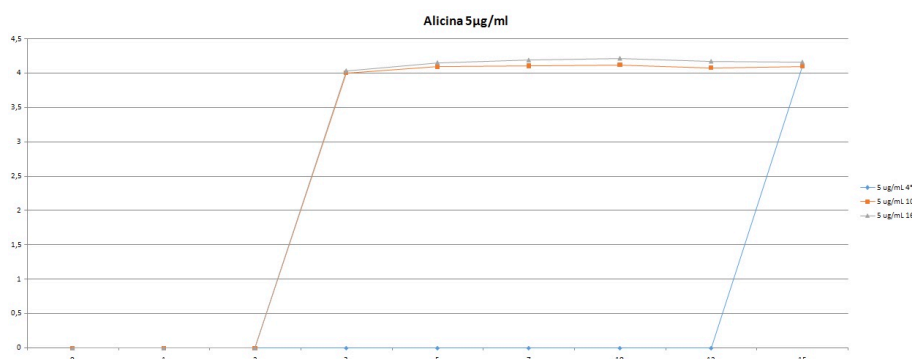


Figura 18. Crecimiento de *B. thermosphacta* a distintas temperaturas con 5 µg/mL de alicina

Con 10 µg/mL se consiguió aumentar la fase de latencia hasta el día 7 a 10 °C, pero no se obtuvo diferencia a 16 °C. Por el contrario, no se registró crecimiento a 4 °C. También se consiguió disminuir significativamente la concentración final y la velocidad de crecimiento máxima a ambas temperaturas, tal y como se observa en la Figura 19, por lo que se puede deducir que a esta concentración la alicina tiene un ligero efecto bactericida.

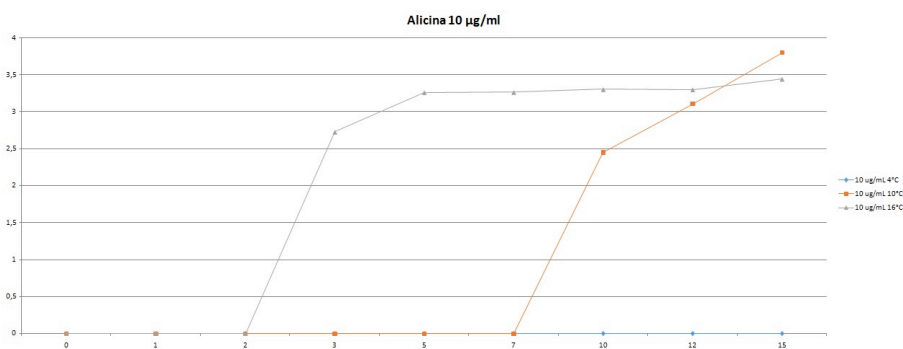


Figura 19. Crecimiento de *B. thermosphacta* a distintas temperaturas con 10 µg/mL de alicina

Finalmente, para la concentración de 12 µg/mL se observó un aumento de la fase de latencia hasta el día 8 y 7 para 10 °C y 16 °C, respectivamente (Figura 20). De nuevo no se observó crecimiento a 4 °C. De igual manera, se redujo el recuento máximo y la velocidad máxima de crecimiento, confirmando el efecto bactericida de la alicina a concentraciones superiores a 10 µg/mL.

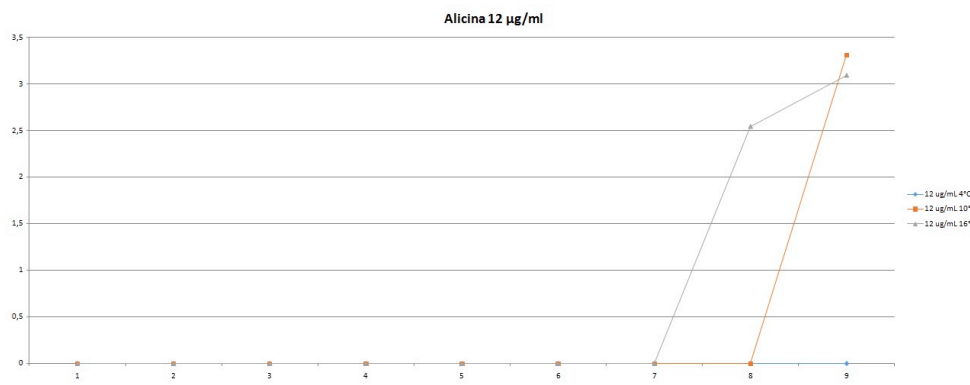


Figura 20. Crecimiento de *B. thermosphacta* a distintas temperaturas con 12 µg/ml de alicina

4.2.3. Estudio de la influencia de diversos aditivos sobre el crecimiento de *B. thermosphacta*

En los controles (0 µg/ml) de la Figura 21, se observa que la adición de los otros aditivos por separado no produjo apenas ninguna diferencia significativa en el crecimiento de *B. thermosphacta*. Tan solo el lactato sódico a una concentración de 40 g/L tuvo un cierto efecto bacteriostático sobre el microorganismo, aumentando en un día la fase de latencia y acortando la fase de crecimiento exponencial.

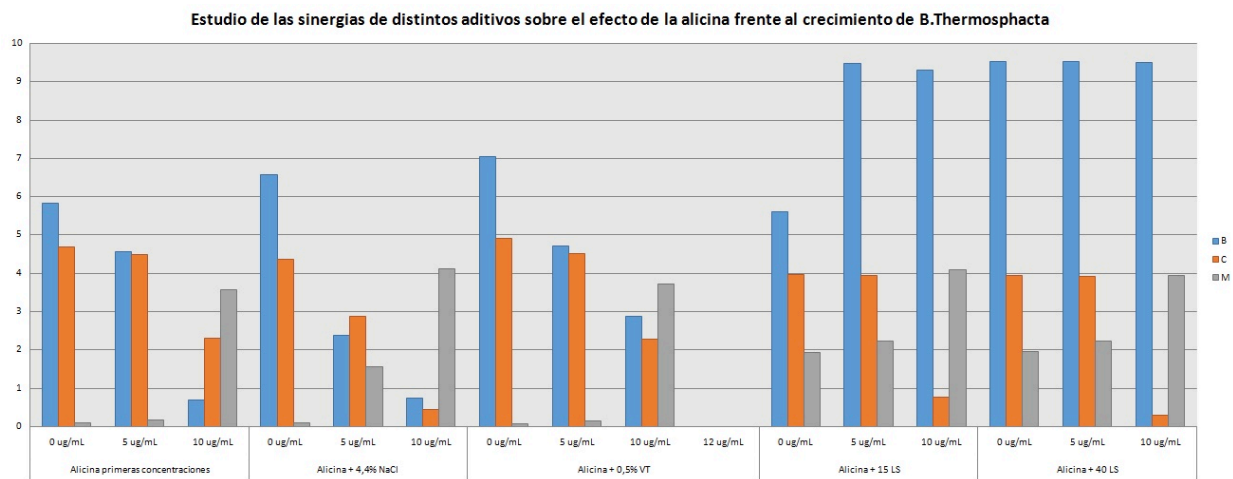


Figura 21. Parámetros de crecimiento de *B. thermosphacta* con distintas concentraciones de alicina y diversos aditivos.

4.2.4. Estudio *in vitro* de la sinergia entre el cloruro sódico y la alicina frente a *B. thermosphacta*

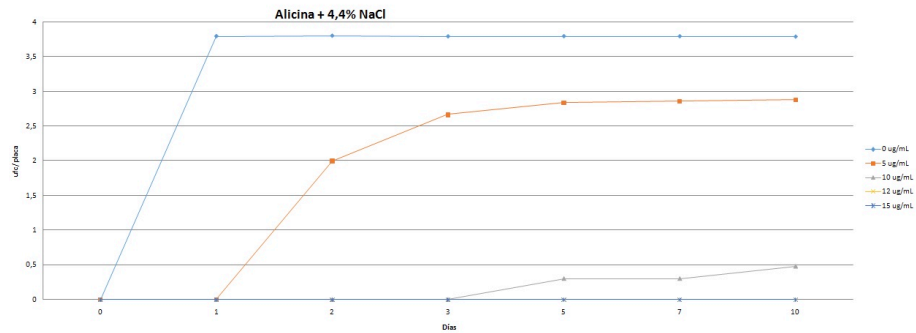


Figura 22. Crecimiento de *B. thermosphacta* con distintas concentraciones de alicina y 4,4% de NaCl

Como se observa en la Figura 22 la adición de NaCl tiene un efecto sinérgico con la alicina reduciendo el recuento final con respecto a control en 1ulog en todas las concentraciones, lo que demuestra el efecto bactericida de la combinación, y aumentando también la fase de latencia, lo que demuestra su efecto bacteriostático.

4.2.5. Estudio *in vitro* de la sinergia entre el vinagre y la alicina frente a *B. thermosphacta*

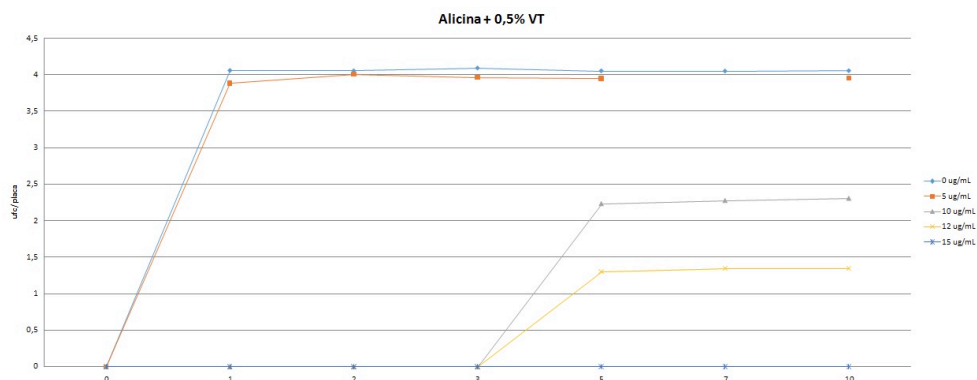


Figura 23. Crecimiento de *B. thermosphacta* con distintas concentraciones de alicina y 0,5% vinagre

Como se observa en la Figura 23, el vinagre al 0,5% no presentó ningún efecto sinérgico con la alicina ante el crecimiento de *B. thermosphacta*: ninguno de los parámetros de crecimiento se vio modificado en presencia de la combinación, si se compara con el control con alicina.

4.2.6. Estudio "in vitro" de la sinergia entre el lactato sódico (LS), a concentraciones de 15 y 40 g/L, y la alicina frente al crecimiento de *B. thermosphacta*

El lactato sódico manifestó, a ambas concentraciones, un efecto sinérgico potenciador de la alicina, que se observó especialmente a la concentración de 12 µg/ml de alicina que no se había detectado en combinaciones anteriores.

4.2.6.1. Lactato sódico 15 g/L

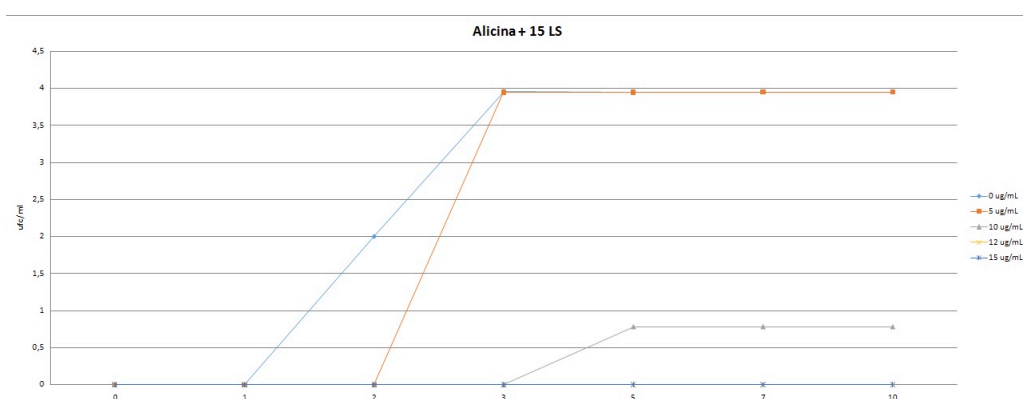


Figura 24. Crecimiento de *B. thermosphacta* con distintas concentraciones de alicina y 15 g/L de lactato sódico

Como se observa en la Figura 24, 15 g/L de lactato sódico consiguieron aumentar la fase de latencia en 1 día. Además, se observó un efecto sinérgico con la concentración más baja de alicina (5 µg/ml), aumentando en 1 día la fase de latencia con respecto a solo el LS y 2 días con respecto al control. A su vez, la velocidad de crecimiento fue menor, lo que aumentó la duración de la fase de crecimiento en un día. A concentraciones de 10 µg/ml, la fase de latencia aumentó hasta el día 3 y disminuyó drásticamente el recuento final por debajo de 1 ulog, por lo que a dichas concentraciones y en sinergia con el LS, la alicina tendría efecto bactericida.

4.2.6.2. Lactato sódico 40 g/L

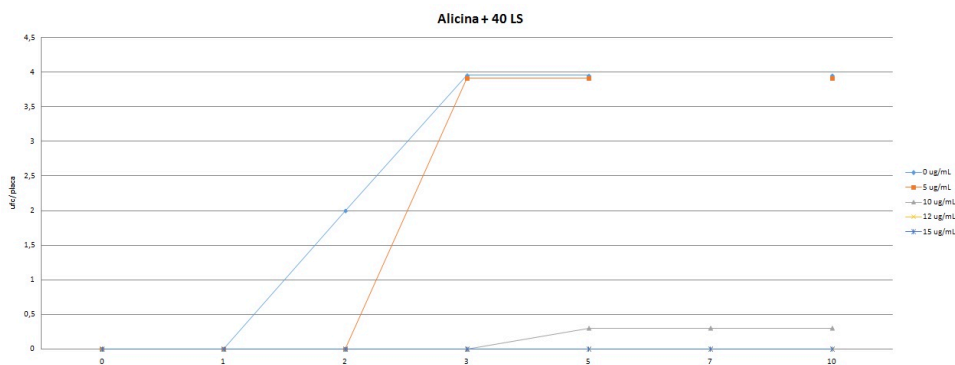


Figura 25. Crecimiento de *B. thermosphacta* con distintas concentraciones de alicina y 40 g/L de lactato sódico

Los datos obtenidos con 40 g/L de lactato sódico fueron muy similares a los obtenidos con 15 g/mL de LS en el caso del control y de la concentración de 5 µg/mL, pero a una concentración de 10 µg/ml de alicina se observó un notable efecto. La fase de latencia duró, nuevamente, 3 días, pero el recuento final disminuyó por debajo de las 0,5 ulog, demostrando un muy notable efecto bactericida de la combinación.

5. CONCLUSIONES

1. La atmósfera modificada reduce el recuento final de las hamburguesas, pero no aumenta la fase de latencia ni modifica significativamente el resto de parámetros de crecimiento. Este efecto se hace más notorio en *B. thermosphacta* que en el resto de microorganismos.
2. Los sulfitos no tienen ningún efecto significativo frente al crecimiento de ningún grupo microbiano de los estudiados en hamburguesas de pollo.
3. pH y NBVT no pueden utilizarse como indicadores tempranos del fin de la vida útil debido a que sus valores cambian cuando ya se puede detectar el mal estado de la hamburguesa organolépticamente.
4. La alicina a concentraciones $>10 \mu\text{g/ml}$ presenta una notable acción antimicrobiana sobre *B. thermosphacta*, aumentando la fase de latencia y reduciendo el recuento final.
5. Tanto la sal como el lactato sódico muestran un efecto sinérgico con la alicina, que se manifiesta con un alargamiento de la fase de latencia –efecto bacteriostático- y disminuyendo el recuento final –efecto bactericida.

CONCLUSIONS

1. The modified atmosphere reduces the final recount but doesn't increase the latency phase and hardly the rest growth parameters, and if it does, it isn't in a significative way. This effect becomes more evident in *B.thermosphacta* that in other microorganisms.
2. Sulphites have no significant effect on the growth of any of the microbial groups studied in chicken hamburgers.
3. pH and NBVT cannot be used as early end-of-life indicators because their values change when the poor condition of the hamburger can already be detected organoleptically.
4. Allicin at concentrations $>10 \mu\text{g/ml}$ registers antimicrobial action by increasing the latency phase and reducing the final count.
5. Both salt and LS had a synergistic effect with allicin, lengthening the latency phase and decreasing the final count.

6. Valoración personal

En el periodo de tiempo que he realizado mi trabajo he pasado por diferentes etapas. En un principio me encontré un poco perdido, pues desconocía todo el trabajo que conlleva un trabajo de investigación. Conforme fui realizando el estudio me surgieron algunas dificultades, sobre todo con el tiempo disponible. La parte experimental me ha resultado un poco más ardua, además de ser el inicio, necesité tiempo hasta familiarizarme con el laboratorio, más que por la dificultad de las técnicas, por el gran volumen de trabajo realizado.

En general, la experiencia ha tenido una trayectoria ascendente, ya que conforme pasaban los días estaba más suelto en el laboratorio y en el tratamiento de los datos. El objetivo del estudio me ha resultado muy interesante, además habiendo encontrado resultados satisfactorios. Me ha servido para aprender y ampliar conocimientos, mejorar mi redacción y adquirir destreza en el manejo de bibliografía tanto impresa como online y a enriquecerme culturalmente.

Por supuesto, además de mi tiempo y esfuerzo, parte de este trabajo es debido a la ayuda y apoyo de M^a Jesús Serrano y todos sus consejos, y a Santiago Condón como director de este trabajo.

7. Bibliografía

- Alonso, J.** (2007). "Tratado de fitofármacos y nutracéuticos." Rosario: Corpus Editorial.
- Alvarado, C. y McKee, S.** (2007). "Marination to Improve Functional Properties and Safety of Poultry Meat". *Journal of Applied Poultry Research*, 16(1), pp. 113-120. DOI: 10.1093/japr/16.1.113.
- Antonacopoulos, N.** (1960). "Verbesserte Apparatur zur quantitativen destillation wasserdampfllüchtiger stoffe. Z. Lebensmittel untersuch.u.Forsch." 113: 113-116
- Borch, E., Kant-Muermans, M. y Blixt, Y.** (1996). "Bacterial spoilage of meat and cured meat products". *International journal of food microbiology*, 33(1), pp. 103-120 DOI: 10.1016/0168-1605(96)01135-X.
- Burt, S.** (2004). "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review". *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), pp. 223-253. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.
- Cavallito, C.J. y Bailey, J.H.** (1944). "Preliminary Note on the Inactivation of Antibiotics". *Science (American Association for the Advancement of Science)*, 100(2600), pp. 390 DOI: 10.1126/science.100.2600.390.
- Chlebicz, A., & Ślizewska, K.** (2018). Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 1–28. <https://doi.org/10.3390/ijerph15050863>
- Dainty, R.H. y Mackey, B.M.** (1992). "The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes". *Journal of Applied Bacteriology*, 73(21), pp. 103s-114s DOI: 10.1111/j.1365-2672.1992.tb03630.x.
- Decreto 2484/1967**, de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español BOE núm. 248, de 17/10/1967.
- European Food Safety Authority, EFSA**, (2010). "The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008". (2010). *EFSA journal*, 8(1), pp. 1496-n/a DOI: 10.2903/j.efsa.2010.1496.
- Fundación Vasca de Seguridad Alimentaria, ELIKA** (2022a). Ficha de peligros: Campylobacter. Disponible en: <https://seguridadalimentaria.elika.eus/fichas-de-peligros/campylobacter/>.
- Fundación Vasca de Seguridad Alimentaria, ELIKA** (2022b). Ficha de peligros: Listeria . Disponible en: <https://seguridadalimentaria.elika.eus/fichas-de-peligros/listeria/>.
- Fundación Vasca de Seguridad Alimentaria, ELIKA** (2022c). Ficha de peligros: Salmonella. Disponible en: <https://seguridadalimentaria.elika.eus/fichas-de-peligros/salmonella/>.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO** (2014). "Food wastage footprint Full-cost accounting.". Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i3991e.pdf>.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO** (2021). "Índice de desperdicio de alimentos 2021". *Journal of food protection*, , pp. 1-270.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO** (2019). Overview of global meat market developments in 2018. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/3/ca3880en/ca3880en.pdf>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO** (2021). "Meat market review: Overview of global meat market developments in 2020", March 2021. Rome.

- Feldberg, R.S., Chang, S.C., Kotik, A.N., Nadler, M., Neuwirth, Z., Sundrstorm, D.C. y Thompson, N.H.** (1988). "In vitro mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32(12), pp. 1763-1768 DOI: 10.1128/AAC.32.12.1763.
- Font Quer, P.** (2007). "Plantas medicinales. El Dioscórides renovado, 8ª ed." Barcelona. Editorial Península. pp. 887.890
- Gibson, A.M., Bratchell, N. y Roberts, T.A.** (1988). "Predicting microbial growth: growth responses of salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature". *International Journal of Food Microbiology*, 6(2), pp. 155-178. DOI: 10.1016/0168-1605(88)90051-7.
- Guerrero-Legarreta, I.** (2014). "MEAT AND POULTRY | Spoilage of Cooked Meat and Meat Products". En: *Encyclopedia of Food Microbiology*. (Second Editioned.) Elsevier Ltd, pp. 508-513.
- Jay, J.M., Loessner, M.J. y Golden, D.A.** (2005). "Modern Food Microbiology." (7a ed.) Estados Unidos: Springer
- Leroi, F., Fall, P.A., Pilet, M.F., Chevalier, F. y Baron, R.** (2012). "Influence of temperature, pH and NaCl concentration on the maximal growth rate of *Brochothrix thermosphacta* and a bioprotective bacteria *Lactococcus piscium* CNCM I-4031". *Food Microbiology*, 31(2), pp. 222-228. DOI: 10.1016/j.fm.2012.02.014.
- López-Brea, M. y Domingo, D.** (2003). "Plantas con acción antimicrobiana". *Revista española de quimioterapia*, 16(4), pp. 385-393.
- Mahmoud, S.S. y Croteau, R.B.** (2002). "Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants". *Trends in Plant Science*, 7(8), pp. 366-373. DOI: 10.1016/s1360-1385(02)02303-8
- Marin, J** (2021). "Selección de antimicrobianos para la conservación de derivados de carne de aves" Trabajo de Fin de Grado, Universidad de Zaragoza.
- Meredith, H., Valdramidis, V., Rotabakk, B.T., Sivertsvik, M., McDowell, D. y Bolton, D.J.** (2014). "Effect of different modified atmospheric packaging (MAP) gaseous combinations on *Campylobacter* and the shelf-life of chilled poultry fillets". *Food microbiology*, 44, pp. 196-203 DOI: 10.1016/j.fm.2014.06.005.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación** (2020). "Informe del consume alimentario en España en 2019." Madrid: MAPA.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación,** (2021). "El sector de la avicultura de carne en cifras: Principales Indicadores Económicos". MAPA: Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios, Madrid.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación,** (2021). "El sector de cerdo en cifras: Principales Indicadores Económicos". MAPA: Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios, Madrid.
- Miron, T., Listowsky, I. y Wilchek, M.** (2010). "Reaction mechanisms of allicin and allyl-mixed disulfides with proteins and small thiol molecules". *European journal of medicinal chemistry*, 45(5), pp. 1912-1918 DOI: 10.1016/j.ejmech.2010.01.031.
- Nychas, G.E., Skandamis, P.N., Tassou, C.C. y Koutsoumanis, K.P.** (2008). "Meat spoilage during distribution". *Meat science*, 78(1), pp. 77-89 DOI: 10.1016/j.meatsci.2007.06.020.

- Rabinkov, A., Miron, T., Konstantinovski, L., Wilchek, M., Mirelman, D. y Weiner, L. (1998).** "The mode of action of allicin: trapping of radicals and interaction with thiol containing proteins". *Biochimica et biophysica acta*, 1379(2), pp. 233-244 DOI: 10.1016/S0304-4165(97)00104-9.
- Reglamento (CE) n o 2073/2005 de la Comisión**, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. DO L 338 de 22.12.2005, p. 1/26
- Reglamento (CE) nº 2074/2005 de la Comisión**, de 5 de diciembre de 2005, por el que se establecen medidas de aplicación para determinados productos con arreglo a lo dispuesto en el Reglamento (CE) nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo y para la organización de controles oficiales con arreglo a lo dispuesto en los Reglamentos (CE) nº 854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo y (CE) nº 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, se introducen excepciones a lo dispuesto en el Reglamento (CE) nº 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo y se modifican los Reglamentos (CE) nº 853/2004 y (CE) nº 854/2004. DOUE núm. 338, de 22 de diciembre de 2005, páginas 27 a 59
- Reglamento de Ejecución (UE) 2019/627 de la Comisión**, de 15 de marzo 2019, por el que se establecen disposiciones prácticas uniformes para la realización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano, de conformidad con el Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se modifica el Reglamento (CE) n.º 2074/2005 de la Comisión en lo que respecta a los controles oficiales. C/2019/13DO. L 131 de 17.5.2019, p. 51/100.
- Reglamento(CE) No 1334/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo** de 16 de diciembre de 2008 sobre los aromas y determinados ingredientes alimentarios con propiedades aromatizantes utilizados en los alimentos y por el que se modifican el Reglamento (CEE) no 1601/91 del Consejo, los Reglamentos (CE) no 2232/96 y (CE) no 110/2008 y la Directiva 2000/13/CE DO L 354 de 31.12.2008, p. 34
- Remenant, B., Jaffrès, E., Dousset, X., Pilet, M.R. y Zagorec, M. (2015).** "Bacterial spoilers of food: behavior, fitness and functional properties". *Food Microbiology*, 45, pp. 45-53. DOI: 10.1016/j.fm.2014.03.009.
- Rodrigues, B.L., Alvares, T.d.S., Sampaio, G.S.L., Cabral, C.C., Araujo, J.V.A., Franco, R.M., Mano, S.B. y Conte Junior, C.A. (2016).** "Influence of vacuum and modified atmosphere packaging in combination with UV-C radiation on the shelf life of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets". *Food Control*, 60, pp. 596-605 DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.09.004.
- Rouger, A., Tresse, O. y Zagorec, M. (2017).** "Bacterial Contaminants of Poultry Meat: Sources, Species, and Dynamics". *Microorganisms*, 5(3), pp. 50-66. DOI: 10.3390/microorganisms5030050.
- Sánchez, J. (2020)** "Mejora de la composición de la salmuera para prolongar la vida útil de la carne de ave" Trabajo de Fin de Grado, Universidad de Zaragoza.
- Small, L.D., Bailey, J.H. y Cavallito, C.J. (1947).** "Alkyl Thiolsulfonates". *Journal of the American Chemical Society*, 69(7), pp. 1710-1713 DOI: 10.1021/ja01199a040.

8. ANEXO

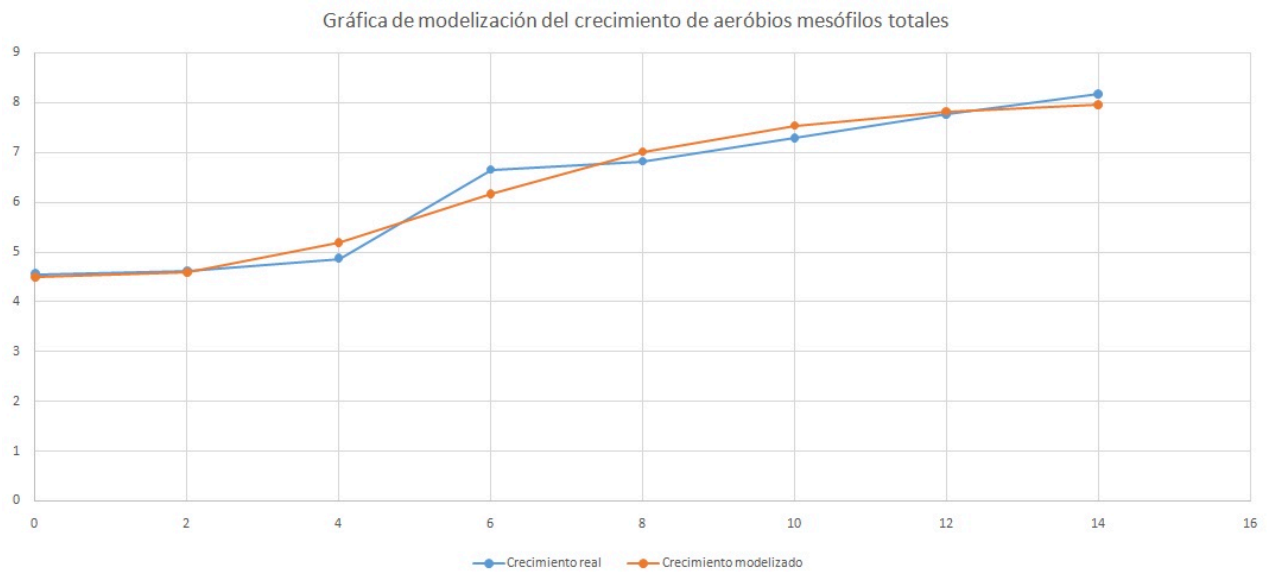


Figura 26. Ejemplo del ajuste entre el crecimiento real y el crecimiento modelizado con Gompertz de aeróbios mesófilos totales en hamburguesas de pollo almacenadas en atmósfera protectora. Se modelizó sobre la media de crecimiento de dos réplicas.

	Mesófilos			Psicrótrofos			Enterobacterias			B.thermosphacta		
	Atm	Sin	Con	Atm	Sin	Con	Atm	Sin	Con	Atm	Sin	Con
A	4,492	4,586	4,451	3,858	4,123	3,939	3,069	3,211	3,263	3,274	3,066	3,044
C	3,586	3,809	4,535	3,735	3,970	4,069	6,236	5,841	5,266	3,050	4,423	4,481
M	5,300	5,340	6,064	4,800	4,937	4,818	7,416	6,561	6,582	4,667	4,546	4,381
B	0,384	0,448	0,328	1,150	1,421	1,201	0,281	0,308	0,349	0,531	0,511	0,384
RMSE	0,116	0,281	0,270	0,154	0,570	0,500	0,144	0,024	0,086	0,087	0,203	0,271

Tabla 3. Parámetros de modelización del crecimiento de distintos grupos microbianos en hamburguesas de pollo. Se modelizó sobre la media de crecimiento de dos réplicas.

0 ug/mL	Control	4,4% NaCl	0,5% VT	15 LS	40 LS
A	-0,759	-0,560	-0,845	-0,002	-0,000
B	5,835	6,566	7,045	5,608	9,517
C	4,680	4,357	4,907	3,959	3,953
M	0,102	0,109	0,080	1,931	1,960
RMSE	0,011	0,000	0,001	0,000	0,000

Tabla 4. Parámetros de modelización del crecimiento de *B. thermosphacta* con distintos componentes, sin alicina

	Alicina primeras concentraciones			Alicina + 4,4% NaCl			Alicina + 0,5% VT			Alicina + 15 LS			Alicina + 40 LS		
	0 ug/ mL	5 ug/ mL	10 ug/ mL	0 ug/ mL	5 ug/ mL	10 ug/ mL	0 ug/ mL	5 ug/ mL	10 ug/ mL	0 ug/ mL	5 ug/mL	10 ug/ mL	0 ug/ mL	5 ug/ mL	10 ug/ mL
A	-0,759	-0,505	-0,029	-0,560	-0,028	-0,008	-0,845	-0,554	-0,000	-0,002	0	0	0	0	0
B	5,835	4,566	0,701	6,566	2,386	0,749	7,045	4,712	2,870	5,608	9,470	9,318	9,517	9,523	9,508
C	4,680	4,485	2,317	4,357	2,868	0,442	4,907	4,523	2,295	3,959	3,946	0,778	3,953	3,915	0,301
M	0,102	0,171	3,580	0,109	1,568	4,131	0,080	0,157	3,729	1,931	2,227	4,090	1,960	2,227	3,933
RMSE	0,011	0,000	0,103	0,000	0,011	0,013	0,001	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Tabla 5. Parámetros de modelización del crecimiento de *B. thermosphacta* con distintas concentraciones de alicina y distintos componentes

	Control			5 ug/mL			10 ug/mL			12 ug/mL		
	4°C	10°C	16°C	4°C	10°C	16°C	4°C	10°C	16°C	4°C	10°C	16°C
A	3,22E-06	6,06E-04	1,58E-05	-5,06E-08	4,52E-06	3,10E-06	0	-1,64E-02	2,77E-06	0	-3,22E-07	-2,32E-04
B	6,87E+00	6,85E+00	2,20E+00	7,20E+00	7,15E+00	7,15E+00	0	6,66E-01	7,13E+00	0	1,86E+00	1,84E+00
C	4,12E+00	4,09E+00	3,09E+00	4,13E+00	4,10E+00	4,18E+00	0	3,76E+00	3,31E+00	0	3,53E+00	3,10E+00
M	2,48E+00	1,50E+00	5,46E-01	1,40E+01	2,48E+00	2,53E+00	0	8,86E+00	2,77E+00	0	1,35E+01	1,11E+01
RMSE	9,10E-03	1,16E-02	5,13E-03	3,77E-14	8,70E-04	2,43E-03	0	7,78E-02	2,19E-02	0	1,59E-12	2,57E-06

Tabla 6. Parámetros de modelización del crecimiento de *B. thermosphacta* con distintas concentraciones de alicina y distintos componentes