



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

AREA DE BIOPROCESOS

TESIS

ELABORACIÓN DE UN PRODUCTO CÁRNICO FUNCIONAL

PRESENTA

Julieta Domínguez Soberanes

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

TUTORES

Dra. Norma Angélica Chávez Vela

Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano

COMITÉ TUTORAL

Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía

Aguascalientes, Ags. Mayo del 2017



**JULIETA DOMINGUEZ SOBERANES
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E.**

Estimada alumna:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: "**ELABORACIÓN DE UN PRODUCTO CÁRNICO FUNCIONAL**", hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 18 de mayo de 2017

"Se lumen proferre"

EL DECANO


M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.



M. EN C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor designado de la estudiante **JULIETA DOMINGUEZ SOBERANES** con ID **184792** quien realizó la tesis titulada: **ELABORACIÓN DE UN PRODUCTO CÁRNICO FUNCIONAL**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para **que ella pueda proceder a imprimirla** y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATE NTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 16 de mayo de 2017.



DRA. NORMA ANGÉLICA CHÁVEZ VELA
Tutor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Consejo Académico
c.c.p.- Secretario Técnico





Casa abierta al tiempo

Postgrado en Biotecnología

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Ciudad de México, 17 de mayo de 2017

M. EN C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS
PRESENTE

Por medio del presente como Tutor designado de la estudiante **JULIETA DOMINGUEZ SOBERANES** con ID **184792** quien realizó la tesis titulada: **ELABORACIÓN DE UN PRODUCTO CÁRNICO FUNCIONAL**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 16 de mayo de 2017.

DRA. GABRIELA MARIANA RODRÍGUEZ SERRANO
Tutor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Secretario Técnico

UNIDAD IZATAPALAPA

Av. San Rafael Atlixco 186. Col. Vicentina, Iztapalapa, C.P. 09340, México D.F. A.P. 55-535

jbg@xanum.uam.mx



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA *Iztapalapa*

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Departamento de Biotecnología

M. EN C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como Asesor designado de la estudiante **JULIETA DOMINGUEZ SOBERANES** con ID **184792** quien realizó la tesis titulada: **ELABORACIÓN DE UN PRODUCTO CÁRNICO FUNCIONAL**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 16 de mayo de 2017.

DR. HÉCTOR BERNARDO ESCALONA BUENDÍA
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Consejo Académico
c.c.p.- Secretario Técnico

Unidad Iztapalapa

Av. San Rafael Atlixco No 186, Col. Vicentina. 09340 Iztapalapa, México, D.F.
E-mail: hbeb@xanum.uam.mx

Tel.: (55) 5804-4600 ext. 2523
<http://cbs.izt.uam.mx>



Julieta Dominguez Soberanes <jdominguez@up.edu.mx>

Fwd: [rmiq] Decisión del editor/a

1 mensaje

Gabriela Rodriguez <gamarose.63@gmail.com>
Para: Julieta Dominguez Soberanes <jdominguez@up.edu.mx>

22 de abril de 2017, 14:03

----- Mensaje reenviado -----

De: "Jaime Vernon" <jvemoncarter@gmail.com>

Fecha: 21 abr. 2017 10:39 PM

Asunto: [rmiq] Decisión del editor/a

Para: "Doctora Gabriela Mariana Rodriguez Serrano" <gamarose.63@gmail.com>

Cc:

Gabriela Mariana Rodriguez Serrano, Julieta Domínguez Soberanes, M. en B., Andrea De la Rocha González, Norma Chávez-Vela, Hector Bernardo Escalona Buendía, Angélica Flores-Nájera:

La edición de su envío, "Diseño de un producto de cerdo listo para comer elaborado mediante la técnica de Sous Vide basado en su análisis sensorial y su índice prebiótico," se ha completado. Ahora lo enviaremos a producción.

Submission URL: <http://www.rmiq.org/ojs/index.php/rmiq/authorDashboard/submission/37>

Jaime Vernon

UAM-I

jvemoncarter@gmail.com

Revista Mexicana de Ingeniería Química

<http://www.rmiq.org/ojs/index.php/rmiq>



Agradecimientos

A la Dra. Gabriela Rodríguez Serrano por su ejemplo, amistad y apoyo durante mi trayectoria profesional.

A la Dra. Norma Angélica Chávez Vela por el apoyo que me brindó durante este doctorado, por sus consejos y grandes enseñanzas.

Al Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía por compartir sus conocimientos y por su guía durante este proceso de aprendizaje.

A la Universidad Panamericana Aguascalientes, por haberme apoyado para desarrollar esta tesis doctoral, en especial al Dr. José Antonio Esquivias Romero, Dr. Ramiro Velázquez Guerrero y a la Ing. Mercedes Urzúa González. Además, a mis amigos investigadores, Dr. José Sebastián Gutiérrez Calderón, la M. en C. Claudia Nallely Sánchez Gómez y la Mtra. Verónica Castro Martínez. Con mucho cariño a todos mis compañeros de la Facultad de Ingeniería y de la Escuela en Dirección de Negocios Gastronómicos, en particular a Erika, Mitzi, Cecilia, Sandra, Carolina, David y Miguel. A todos y cada uno de mis alumnos que siempre me han motivado a seguirme preparando, en particular a Andrea, Barbara y Gaby.

A Empacadora de Carnes San Francisco, S.A. de C.V. por haber creído y apoyado un sueño, en especial a M.V.Z. Jorge Alberto Sandoval Romo, Ing. Francisco Najera Romo, M.E.A.P. Héctor Calvillo Marmolejo y M.E.A.P Hugo Germán Ramírez Veneces. Gracias a todos los que forman parte de la empresa ya que siempre han mostrado disposición para compartirme su experiencia en la industria de alimentos.

A CONACyT por apoyar al proyecto de INNOVAPYME 213518, titulado: *Centro de Desarrollo y Escalamiento Industrial para la Innovación en Subproductos y Productos Cárnicos Bioconservados*.

A los investigadores y compañeros de la Universidad Autónoma de Aguascalientes por el apoyo brindado para que este proyecto de investigación pudiera desarrollarse. En particular a mis compañeras del doctorado Karina, Adriana, Alma, Andrea, Carolina y Maricarmen. A la Posta Zootécnica de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, en especial a la

Maestra María Magdalena Ramírez Gómez, Geraldina y Karina, ya que me compartieron sus conocimientos con mucha amabilidad.

A la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa por haberme formado como profesionista, en especial a los investigadores: Dr. Jesús Gerardo Saucedo Castañeda, M. en C. Lorena del Carmen Gómez Ruíz, Dr. Mariano García Garibay, Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero, Quim. Alma Rosa Estrada Godina y Dra. Elsa Bosques Molina. A la Dra. Edith Ponce Alquicira y a la Dra. Yenizey Merit Álvarez Cisneros por el apoyo brindado para el análisis de oxidación proteica y lipídica. Además a la Biol. Angélica Flores Najera por su apoyo.

A todos las familias amigas que me han motivado a seguir adelante con la tesis: Armendáriz Curiel, Hernández Otalengo, Meda Llamas, Alarcón Lozada, Gutiérrez Rojano, Villalobos Araujo, Castañeda Sánchez y Rodríguez Licea. A mis amigas: Fátima, Elisa, Montse, Delia Cristina, Marcela, Liz y Yolia. A los amigos rotarios que a través de mi esposo me han apoyado.

A la familia Domínguez-Soberanes, Domínguez-Orozco, Soberanes-Rosales y Licea-Ortiz, por el apoyo brindado, en especial a mi madre, mis hermanos, tíos, cuñados y suegros. A mi papá quien me enseñó que cada despertar es la esperanza de un futuro mejor.

A mi esposo por todo su amor, cariño y apoyo incondicional en esta etapa de superación profesional; gracias por tus palabras de aliento. A mis hijos, Samantha, Sara y Carlos Antonio, esperando que este esfuerzo sea un ejemplo de la importancia de la superación profesional, tomando en cuenta el equilibrio que se debe tener en todas las áreas de desarrollo de una persona. A mis hijos postizos, Helena, Tom y Emily por estar en mi vida durante esta etapa de estudios.

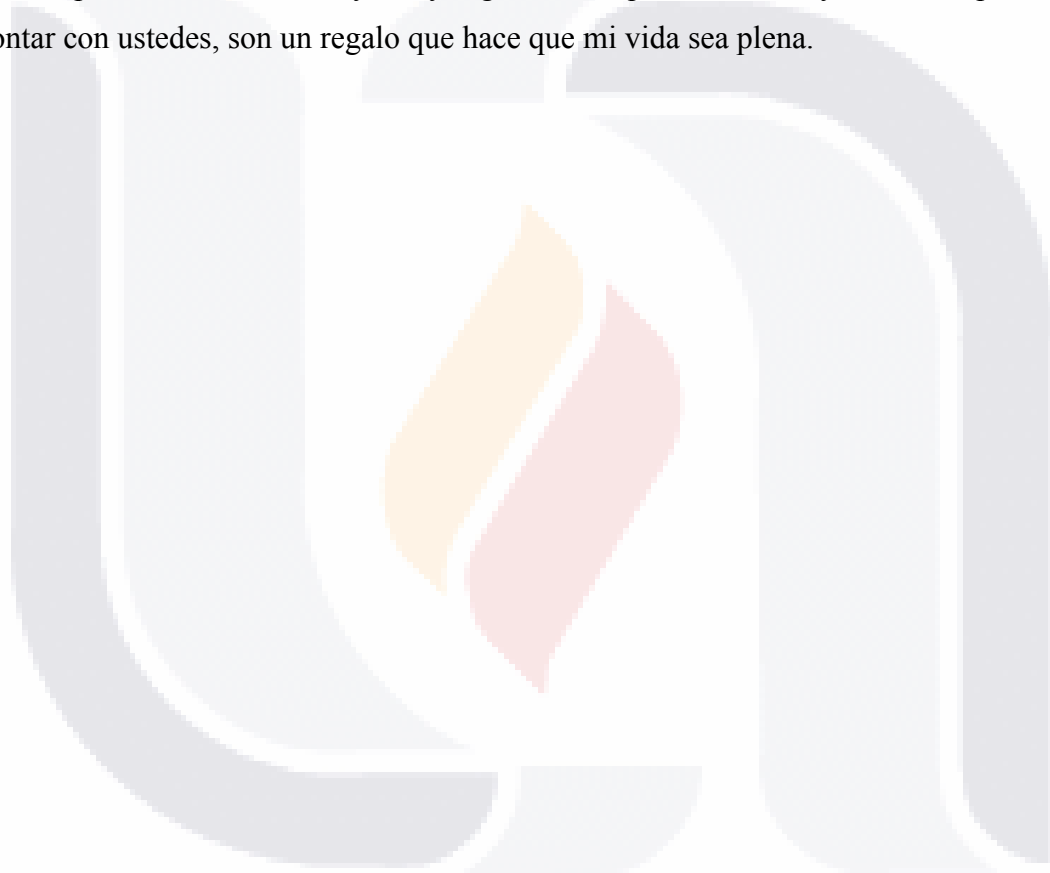
Finalmente, a todas las personas involucradas que aportaron su ayuda y apoyo para que este trabajo experimental pudiera desarrollarse.

Dedicatorias

A Toño, Samantha, Sara y Carlos Antonio; porque siempre me han apoyado a pesar del sacrificio que han tenido que hacer para que llegue a la culminación de este proyecto.

Particularmente, a mi compañero de vida, Toño, porque siempre estuvo motivándome a lograr esta meta.

Lo más importante es la familia y estoy orgullosa de que Dios me haya dado la oportunidad de contar con ustedes, son un regalo que hace que mi vida sea plena.



Índice General

Índice General.....	1
Índice de Tablas.....	5
Índice de Ecuaciones	7
Índice de Figuras	8
Resumen	11
Abstract.....	13
1. Introducción.....	15
2. Marco Teórico	17
2.1. Carne de cerdo	18
2.1.1. Composición e importancia nutricional de la carne.....	19
2.2. Alimentos Funcionales.....	20
2.2.1. Fibras y Prebióticos.....	21
2.2.2. Probiótico	25
2.2.2.1. Bacterias ácido lácticas productoras de exopolisacárido.....	28
2.3. Biopreservación	30
2.3.1. Microorganismos responsables de deterioro en productos cárnicos.....	30
2.3.2. Bacterias ácido lácticas como cultivos bioprotectores.....	32
2.3.3. Compuestos antimicrobianos producidos por bacterias ácido lácticas	33
2.3.3.1. Ácido Láctico	33
2.3.3.2. Peróxido de Hidrógeno.....	34
2.3.3.3. Bacteriocinas y péptidos.....	35
2.4. Antimicrobianos Naturales	36

2.5. Desarrollo de productos cárnicos marinados	38
2.5.1. Técnica de Cocción <i>Sous Vide</i>	39
2.5.2. Análisis sensorial como herramienta de calidad y del desarrollo de alimentos. .41	
2.5.3. Vida de Anaquel.....	43
2.5.3.1. Vida de Anaquel en Carne.....	46
2.6. Productos marinados bioconservados	46
3. Hipótesis	48
4. Objetivo General.....	49
4.1. Objetivos Particulares	49
5. Metodología.....	50
5.1. Desarrollo de la composición de la marinada.....	51
5.1.1. Elaboración de la marinada.....	51
5.1.3. Evaluación sensorial.....	53
5.1.4. Reformulación de marinada.....	54
5.1.4.1. Análisis sensorial del prototipo con relación a marcas líderes en el mercado	56
5.1.4.2. Evaluación de parámetros químicos mediante infrarrojo cercano.....	58
5.2. Evaluación de capacidad prebiótica de las bacterias ácido lácticas.....	59
5.2.1. Bacterias ácido lácticas.....	59
5.2.2. Fermentación.....	60
5.2.2.1. Preparación del pre-inóculo de las bacterias ácido lácticas (BAL).....	60
5.2.2.2. Preparación del medio de cultivo para las bacterias ácido lácticas	60
5.2.3. Determinación de índice prebiótico (IP).....	61
5.3. Determinación de compuestos antimicrobianos producido por bacterias ácido lácticas.	62
5.3.1. Preparación del pre-inóculo de bacterias indicadoras <i>E. coli</i> y <i>L. innocua</i>	63
5.3.2. Fermentación de las BAL.....	63

5.3.3. Obtención de sobrenadantes con acción antimicrobiana.....	64
5.3.4. Determinación de inhibición por los compuestos antimicrobianos producidos durante la fermentación sobre microorganismos indicadores.	65
5.4. Determinación de bioconservación del producto marinado durante el almacenamiento.	66
5.4.1. Propagación de microorganismos	66
5.4.2. Evaluación Fisicoquímica	67
5.4.2.1. Evaluación de Color	67
5.4.3. Oxidación lipídica y proteica.....	69
5.4.4. Análisis de Perfil de Textura (TPA).....	71
5.4.5. Evaluación sensorial.....	72
5.4.6. Cuantificación de microorganismos.....	73
5.5. Vida de anaquel del prototipo.....	73
5.5.1. Determinación matemática de vida de anaquel.....	74
6. Resultados y Discusión.....	77
6.1. Desarrollo y selección de la composición de la marinada.....	77
6.1.1.2. Análisis Sensorial de las formulaciones.....	77
6.1.1.2.1. Análisis de Segmentación.....	77
6.1.1.2.2. Análisis de Justamente Correcto (JAR) y Prueba de Penalidades.....	82
6.3. Reformulación para establecer el prototipo cárnico funcional.	91
6.3.1. Análisis sensorial del prototipo final.....	92
6.3.2. Análisis bromatológico	100
6.4. Evaluación de índice prebiótico de los ingredientes utilizados en la formulación..	103
6.5. Capacidad bacteriocida o bacteriostática de las bacterias ácido lácticas.....	106
6.5.1. Inhibición sobre crecimiento de <i>E. coli</i>	106
6.5.1.1. Inhibición de crecimiento de <i>E. coli</i> sobre los sobrenadantes de las bacterias lácticas sin tratamiento.....	107

6.5.1.2. Inhibición de crecimiento de <i>E. coli</i> con los sobrenadantes neutralizados de la fermentación de las bacterias lácticas.	108
6.5.1.3. Inhibición del crecimiento de <i>E. coli</i> con los sobrenadantes de la fermentación de las bacterias lácticas tratados con catalasa.....	109
6.5.1.4. Inhibición de crecimiento de <i>E. coli</i> con los sobrenadantes de las bacterias lácticas tratados con proteínasa K.....	109
6.5.2. Inhibición sobre crecimiento de <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	110
6.5.2.1. Inhibición de crecimiento de <i>L. innocua</i> sobre los sobrenadantes sin tratamiento de la fermentación de bacterias ácido lácticas.....	111
6.5.2.2. Inhibición de crecimiento de <i>L. innocua</i> con los sobrenadantes neutralizados de la fermentación de las bacterias lácticas.	111
6.5.2.3. Inhibición del crecimiento de <i>L. innocua</i> con los sobrenadantes de la fermentación de las bacterias lácticas tratados con catalasa.	112
6.5.2.4. Inhibición de crecimiento de <i>L. innocua</i> con los sobrenadantes de la fermentación de las bacterias lácticas tratados con proteínasa K.	113
6.6. Efecto de la inclusión de las bacterias ácido lácticas en el producto cárnico marinado.	119
6.6.1. Análisis de color.....	119
6.6.2. Oxidación de proteínas y lípidos.....	120
6.6.3. Análisis de perfil de textura	122
6.6.4. Análisis Sensorial.....	125
6.6.5. Análisis Microbiológicos	126
6.7. Cálculo de Vida de Anaquel	130
7. Conclusiones.....	134
8. Bibliografía.....	136
Sitiografía.....	152
Anexo. A. Fichas técnicas de prebióticos utilizados	154
Anexo. B. Resultados estadísticos de las pruebas sensoriales relacionados con la evaluación de las formulaciones mediante la técnica de justamente Correcto.	156

Índice de Tablas

Tabla 1. Composición química de la carne en general	20
Tabla 2. Composición química de minerales de la carne	20
Tabla 3. Cambios en la definición de probióticos	26
Tabla 4. Características de bacterias responsables de deterioro de la carne en refrigeración.	31
Tabla 5. Compuestos producidos por bacterias ácido lácticas y su mecanismo antimicrobiano.	33
Tabla 6. Aplicaciones de bacterias ácido lácticas como cultivo bioprotector en distintos alimentos	47
Tabla 7. Formulación porcentual de los ingredientes utilizados	51
Tabla 8. Composición de las cinco formulaciones desarrolladas.....	52
Tabla 9. Composición química de la reformulación de la marinada.....	55
Tabla 10. Composición de ingredientes de la formulación cárnica.....	55
Tabla 11. Composición química del medio simple utilizado	60
Tabla 12. Fuentes de carbono utilizadas para determinar índice prebiótico.....	61
Tabla 13. Matriz de correlación de Spearman de la formulación desarrollada con inulina.....	88
Tabla 14. Correlación entre los atributos analizados del prototipo desarrollado.....	95
Tabla 15. Frecuencia de atributos positivos encontrados en cada una de las marcas evaluadas.....	98
Tabla 16. Frecuencia de atributos negativos encontrados en cada una de las marcas evaluadas.....	98
Tabla 17. Crecimiento de bacterias en el medio simple utilizando los prebióticos.....	103
Tabla 18. Índice prebiótico (IP) de ingredientes calculados de acuerdo a la ecuación modificada de Palfram <i>et al.</i> , 2003).....	104
Tabla 19. Índice prebiótico (IP) de ingredientes calculados de acuerdo a la ecuación modificada de Palfram <i>et al.</i> , 2003).....	106

Tabla 20. Porcentaje de inhibición de *E. coli* por compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias ácido lácticas de estudio..... 116

Tabla 21. Porcentaje de inhibición de *L. innocua* por compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias ácido lácticas de estudio. 117

Tabla 22. Pruebas triangulares de olor con relación al tiempo en pruebas almacenadas a 6°C durante 24 d. 125

Tabla 23. Pruebas triangulares de color con relación al tiempo en pruebas almacenadas a 6°C durante 24 d. 126

Tabla 24. Desarrollo de bacterias ácido lácticas a diferentes temperaturas después de 7 d de almacenamiento 128

Tabla 25. Porcentaje de inhibición de bacterias coliformes observada al aplicar BAL en los sistemas cárnicos..... 129

Tabla 26. Cálculo de la constante de la velocidad de reacción (k)..... 131

Tabla 27. Cálculo de Q_{10} en los prototipos sembrados con las bacterias ácido lácticas.... 131

Tabla 28. Vida de Anaquel establecida por pérdida de color en prototipos elaborados con BAL almacenadas a diferentes temperaturas 133

Tabla 29. Análisis estadístico de segmentación realizado entre los distintos rangos de edades de la población estudiada. 156

Tabla 30. Promedio y desviación estándar llevadas a cabo en pruebas de Justamente correcto para seleccionar el prototipo ideal a partir de cinco distintas formulaciones..... 157

Tabla 31. Matriz de correlación de spearman usada para seleccionar el prototipo a partir de cinco distintas distintas formulaciones. 159

Tabla 32. Prueba de t entre formulaciones evaluadas..... 162

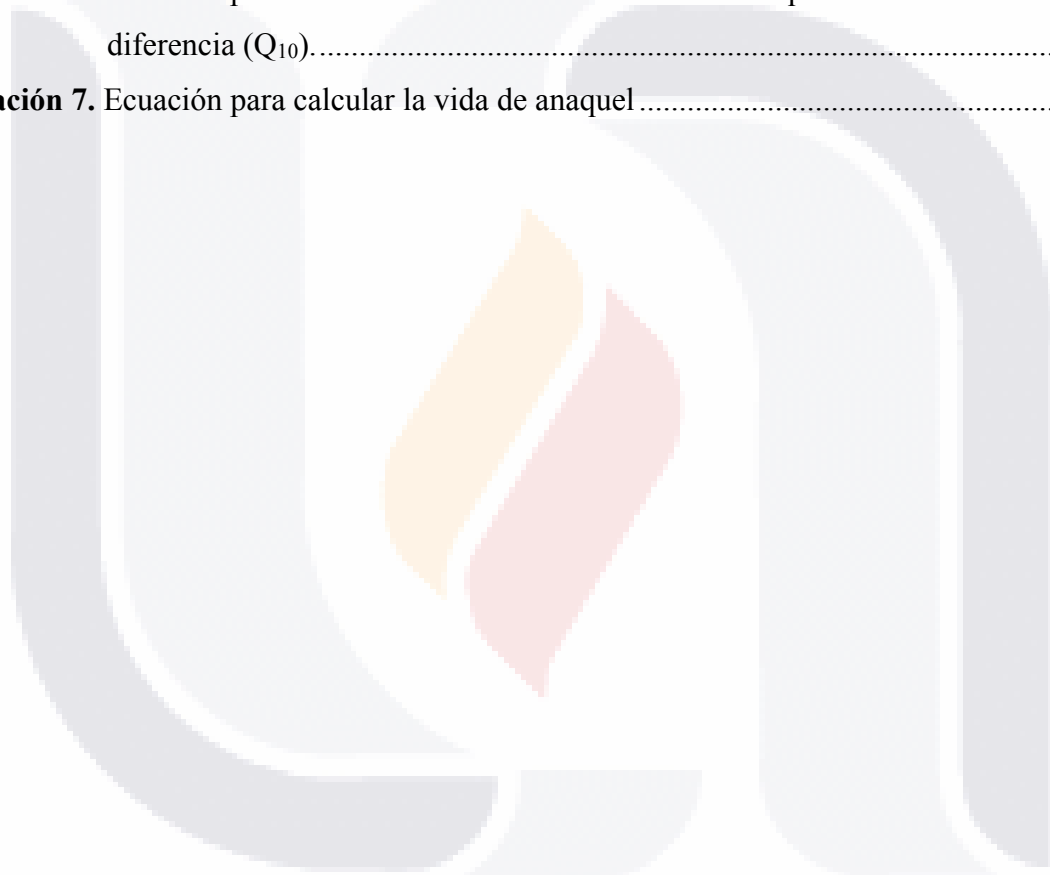
Tabla 33. Prueba de ANOVA para evaluar diferencias entre formulaciones..... 163

Tabla 34. Prueba de t comparación entre tratamientos..... 164

Tabla 35. Prueba de Tukey para establecer diferencias entre formulaciones..... 165

Índice de Ecuaciones

Ecuación 1. Determinación del índice prebiótico.....	62
Ecuación 2. Cálculo del porcentaje de inhibición debida a compuestos antimicrobianos. .	66
Ecuación 3. Ecuación para determinar cambio de color utilizando el sistema L*a*b*	68
Ecuación 4. Ecuación para encontrar la constante de reacción (k _o).....	74
Ecuación 5. Ecuación de Arrhenius para encontrar energía de activación (E _a).....	75
Ecuación 6. Ecuación para calcular la relación entre la vida de anaquel con 10° C de diferencia (Q ₁₀).....	75
Ecuación 7. Ecuación para calcular la vida de anaquel.....	76



Índice de Figuras

Figura 1. Producción nacional, importaciones y exportaciones de carne de cerdo.....	18
Figura 2. Volumen de producción de porcinos en 2012 en miles de toneladas	19
Figura 3. Producción industrial de fructoligosacáridos a través de extractos naturales.....	24
Figura 4. Estructura química de la inulina.....	25
Figura 5. Modelo bidimensional de un producto lácteo fermentado por una bacteria ácido láctica productora de exopolisacárido.....	28
Figura 6. Diagrama de etapas de experimentación.....	50
Figura 7. Ficha resumida de evaluación sensorial de aceptabilidad aplicada a 205 consumidores potenciales de 18 a 65 años de edad.	53
Figura 8. Ficha resumida del cuestionario de evaluación sensorial aplicada a 72 consumidores, donde se comparó el prototipo reformulado con 5 marcas comerciales.....	57
Figura 9. Cromatograma de color.....	68
Figura 10. Análisis de Perfil de Textura (TPA) de las pruebas cárnicas marinadas bioconservadas.	71
Figura 11. Cuestionario resumido de evaluación sensorial mediante una prueba triangular aplicada al panel entrenado.....	72
Figura 12. Análisis de segmentación de las cinco distintas formulaciones evaluadas.....	77
Figura 13. Efecto de edad (años) sobre la preferencia de las formulaciones mediante la técnica de segmentación.	78
Figura 14. Efecto de género sobre la preferencia de las formulaciones mediante el método de segmentación.....	80
Figura 15. Efecto del consumo habitual de cerdo sobre el gusto de las formulaciones de marinadas analizadas mediante la técnica de segmentación.....	80
Figura 16. Efecto del consumo habitual de alimentos con chile sobre el gusto de las formulaciones de marinadas analizadas mediante la técnica de segmentación. ..	81
Figura 17. Predicción de la formulación óptima por medio de la técnica de segmentación mediante el gusto de los consumidores.....	82

Figura 18. Porcentaje de justamente correcto en cada uno de las formulaciones analizadas.
 83

Figura 19. Comparación mediante distintas técnicas sensoriales de las características de la formulación seleccionada (AF3), el cual fue elaborado con inulina de achicoria.
 87

Figura 20. Efecto de los valores de media sobre el porcentaje de variación de los atributos estudiados mediante las pruebas de Justamente Correcto. 89

Figura 21. Análisis de datos JAR mediante modelos thurstonianos. 90

Figura 22. Formulación preferida por los consumidores representado en términos de porcentaje..... 91

Figura 23 . Aceptación general (escala del 1 al 10) del prototipo (Marca 1) en comparación con el resto de las marcas líderes en Aguascalientes. 93

Figura 24. Análisis de Segmentación (LSA) de cinco productos líderes en el mercado comparados con el prototipo desarrollado (Producto 1)..... 94

Figura 25. Análisis de Segmentación (LSA) basado en el gusto de los consumidores, donde se analizan el prototipo desarrollado y se comparan con 5 marcas comerciales.
 95

Figura 26. Análisis de datos JAR mediante modelos thurstonianos. 97

Figura 27. Análisis de segmentación para desarrollar otro prototipo basado en el gusto de los consumidores 99

Figura 28. Composición bromatológica de las marcas de carne de cerdo marinadas líderes en Aguascalientes mediante la técnica de infrarrojo cercano. 100

Figura 29. Etiqueta nutrimental del prototipo elaborado con inulina de achicoria. 102

Figura 30. Inhibición de crecimiento de *E. coli* con los sobrenadantes de la fermentación de bacterias lácticas de estudio sin tratamiento. 107

Figura 31. Inhibición de crecimiento de *E. coli* con los sobrenadantes neutralizados de la fermentación de bacterias lácticas de estudio..... 108

Figura 32. Inhibición de crecimiento de *E. coli* con los sobrenadantes tratados con catalasa de la fermentación de bacterias lácticas de estudio. 109

Figura 33. Inhibición de crecimiento de *E. coli* con los sobrenadantes tratados con proteinasa K de la fermentación de bacterias lácticas de estudio 110

Figura 34. Inhibición de crecimiento de *L. innocua* en los sobrenadantes de la fermentación sin tratamiento de bacterias lácticas de estudio 111

Figura 35. Inhibición de crecimiento de *L. innocua* en los sobrenadantes neutralizados de la fermentación de bacterias lácticas de estudio. 112

Figura 36. Inhibición de crecimiento de *L. innocua* con los sobrenadantes tratados con catalasa de la fermentación de bacterias lácticas de estudio..... 113

Figura 37. Inhibición de crecimiento de *L. innocua* con los sobrenadantes tratados con proteinasa K de la fermentación de bacterias lácticas de estudio. 114

Figura 38. Cambio de color (ΔE) de prototipos almacenados a 6 °C 119

Figura 39. Análisis de componentes principales donde se explica la oxidación de lípidos y proteínas en el prototipo almacenado a 6 °C durante 24 d. 120

Figura 40. Análisis de Perfil de Textura (TPA) representado en una gráfica de telaraña de los prototipos desarrollados con las BAL después de 24 d de fermentación... 123

Figura 41. Crecimiento de las BAL de estudio en el prototipo almacenado a 6° C durante 24 d. 127

Figura 42. Cálculo de la velocidad de crecimiento (μ) de las BAL desarrolladas en el sistema cárnico, almacenado a 6° C..... 127

Figura 43. Muestras almacenadas durante 6 días a 36°C..... 130

Figura 44. Cálculo de las velocidades de reacción a 6°C con respecto al cambio de color (ΔE) de productos cárnicos inoculados con BAL..... 131

Figura 45. Gráfica utilizada para calcular la Energía de Activación (E_a)..... 132

Figura 46. Análisis de Penalidades utilizado para seleccionar el prototipo a partir de distintas formulaciones. 162

Resumen

La tendencia mundial de la alimentación en los últimos años radica en un interés creciente de los consumidores hacia ciertos alimentos, que además del valor nutritivo aporten beneficios al organismo humano, este tipo de alimentos se conoce como funcionales.

Por tal motivo, el objetivo de este estudio fue desarrollar un producto funcional (inclusión de prebióticos) a base de carne de cerdo elaborado mediante la técnica de *Sous Vide*, con buena aceptación sensorial, bioconservado con bacterias ácido lácticas: *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 y *Lb. rhamnosus* GG.

La evaluación de cada uno de los ingredientes usados en la marinada cárnica en relación a su índice prebiótico (IP), reveló que el chipotle (*Capsicum annum*), el ajo (*Allium sativum*) y el romero (*Rosmarinus officinalis*) presentaron un índice prebiótico superior a 1 ($IP \geq 1$). Por otro lado, las formulaciones de las marinadas desarrolladas con fibra de nopal (*Opuntia ficus-indica*), fibra de maíz e inulina de achicoria (*Chicorium intybus*) también exhibieron un índice prebiótico superior a 1. A partir de estas fuentes de fibra se prepararon tres prototipos que fueron sometidos a la aceptabilidad de los consumidores, utilizando diferentes técnicas sensoriales (Análisis de Segmentación, Técnica Justamente Correcta y Análisis de Penalidades; evaluando los atributos de olor, color, acidez, sensación picante, sal, sabor, jugosidad y textura). El prototipo más aceptado fue el que contenía **inulina de achicoria**, que fue analizado mediante la técnica de infrarrojo cercano, lo que arrojó como resultados un contenido de proteína de $14.12 \pm 2.44\%$ y un contenido de grasa de $8.98 \pm 4.9\%$.

Se estudió la capacidad bactericida y bacteriostática de las bacterias ácido lácticas, encontrando que tanto *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 1489 (*Lb.* 1489, láctica) y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2772 (*Lb.* 2772, filante), como *Lb. rhamnosus* GG (*Lb.* GG, probiótica) y la combinación de la bacteria probiótica con las no probióticas, mostraron un efecto bacteriostático de más de 75% contra *L. innocua* y *E. coli*. El prototipo con inulina de achicoria, se inoculó con bacterias ácido lácticas, lo que permitió tener un producto con una vida de anaquel de aproximadamente tres semanas en base a su carga microbiológica, tiempo superior en un 20% al que reportan las industrias cárnicas. Sin embargo, debe de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

tomarse en cuenta que para el producto bioconservado, en base al color, la vida de anaquel es de solo 10 días por el deterioro del mismo.

De tal forma que durante este trabajo se desarrolló un producto cárnico funcional que podría considerarse una buena fuente de fibra de acuerdo a la NOM-086-SSA1-1994; por la incorporación de inulina de achicoria en su formulación en un porcentaje mayor a 2.5% que además posee un índice prebiótico superior a 1. El prototipo además presentó un contenido de proteína comparable a los productos comerciales y un bajo contenido de grasa. Es además, un producto bioconservado por *Lb. rhamnosus* GG y *Lb. delbruecki* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 donde el primero es un probiótico. Sensorialmente, fue aceptado por los consumidores. El prototipo desarrollado (alimento funcional) en el presente estudio puede ser considerado un producto simbiótico por la presencia en su formulación de un probiótico y un prebiótico. Este producto podría ser escalado en la industria de alimentos.

Abstract

Nowadays, consumers are seeking new food products with particular characteristics. To begin with, they are looking for products that are highly nutritive and that can offer health benefits. On the other hand, they are seeking adequate sensory characteristics.

Therefore, the objective of this study was to develop a *Sous Vide* pork-based-ready-to-eat functional product. The product was designed with natural ingredients, and three prebiotic fibers were tested in the formulation: chicory inulin, corn and, nopal fiber. Consumer's acceptability was an important feature of this type of products. In order to achieve biopreservation, two lactic acid bacteria were added: *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772, *Lb. rhamnosus* GG (probiotic).

Ingredients used in the marinade formulation were studied regarding their prebiotic index (PI). Results show that ingredients with good PI (above 1) were obtained with: chipotle (*Capsicum annuum*), garlic (*Allium sativum*) and, rosemary (*Rosmarinus officinalis*). Also, the three prebiotic prototypes developed: nopal fiber (*Opuntia ficus-indica*), corn fiber and, chicory inulin (*Chicorium intybus*), exhibited an adequate prebiotic index.

The prototype developed is nutritive and can promote health, however, it must be accepted for its sensory characteristics, therefore different sensory techniques were applied: Landscape Segmentation Analysis (LSA), Just About Right (JAR), Penalty Analysis (PA), and Check all that Apply (CATA). Results show that the prebiotic formulation added with **chicory inulin** is well accepted by consumers and could be scaled up, considering it a good fiber source. The prototype was analyzed by NIR (Near Infrared), establishing that the prototype could be considered a good protein source (14.12 ± 2.44 %) with low fat content ($8.98 \pm 4.9\%$).

The bacteriocid/bacteriostatic capacity of the lactic acid bacteria of this study was evaluated (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 1489, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772, *Lb. rhamnosus* GG and the combination of both), results reveal that the bacteriostatic effect was above 75% against *L. innocua* and *E. coli*, these last two bacteria are considered indicators of food contamination.

Bacteria was then inoculated in the prototype with chicory inulin, the bacteriocid/bacteriostatic potential was studied. The product had 3 weeks approximately of shelf life, which represents 20% more of what it is reported by the food industry. However, the color changes so much that its shelf life could only be of 10 days for this kind of products which is what the industry reports as usual.

In conclusion, a functional ready to eat pork prototype was developed, which can be considered a good source of prebiotic, also it could be considered a good source of protein and lipids. It is biopreserved and if case of using *Lb. rhamnosus* GG it would be considered a probiotic according to Mexican Norms, NOM-086-SSA1-1994. Therefore, a symbiotic product could be achieved, because the prebiotic characteristic was achieved when chicory inulin was added, as well as, the probiotic *Lb. rhamnosus* GG which was incorporated in combination with *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* NCFB 2772. This product has all the characteristics to be scaled up in the food industry.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

1. Introducción

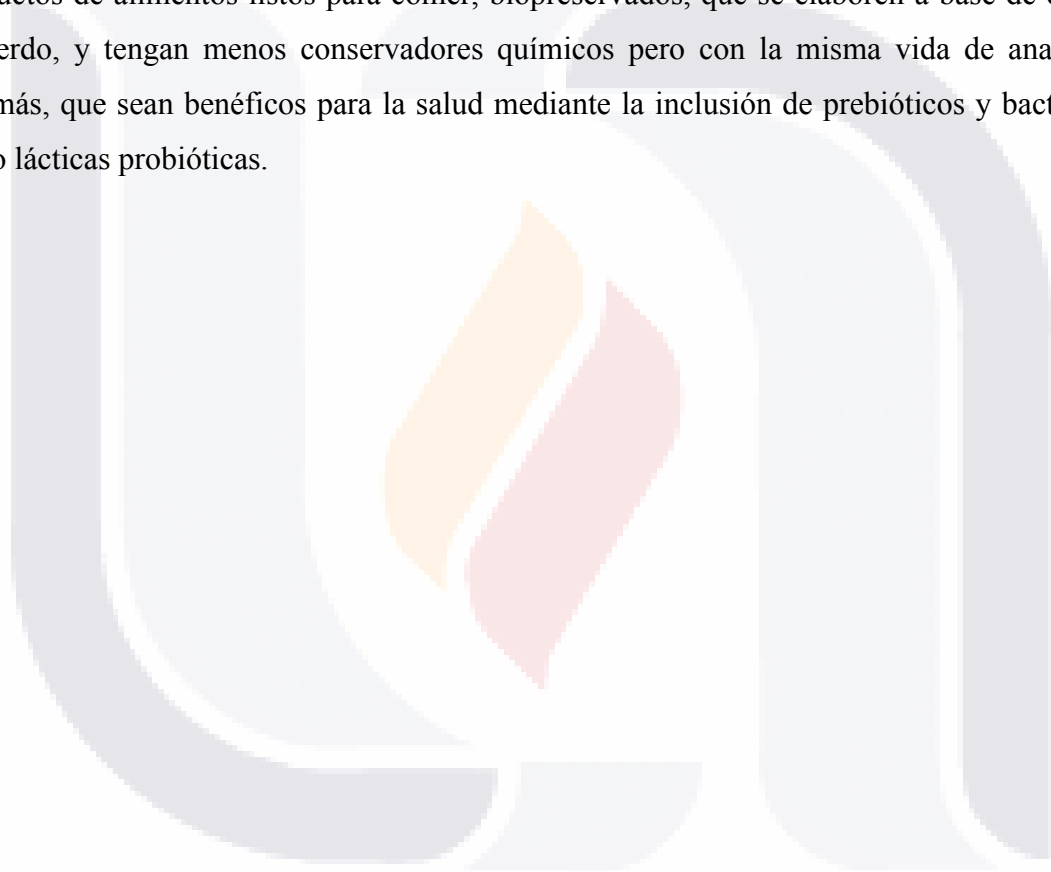
Actualmente, a nivel global existen tendencias de contribuir a mejorar la salud relacionadas con la alimentación, en particular se puede notar que ha crecido la demanda de nuevos productos saludables que ofrecen características específicas al consumidor. Se han buscado alimentos que sean altamente nutritivos y económicamente accesibles, siendo una de las alternativas la proteína animal de bajo costo. La carne de cerdo ofrece estas características debido a que por mejoras genéticas y de alimentación al ganado, presenta menor contenido de grasa ofreciendo en algunos casos componentes químicos intrínsecos favorables. Por ello, este tipo de carne es un excelente alimento ya que además tiene las características nutrimentales y sensoriales adecuadas para ser preparado y consumido de distintas maneras. El sector de los productos alimenticios en los cuales no se invierta gran tiempo para su preparación son altamente solicitados, sobre todo en países desarrollados; como respuesta a esta necesidad ha surgido una nueva rama de alimentos listos para comer (ready-to-eat). Dentro de estos podemos mencionar a los productos marinados que además de ser muy buscados por el consumidor por las características sensoriales que aportan, tienen compuestos antimicrobianos, antioxidantes, etc., que no solo potencian el sabor sino que aumentan la vida de anaquel del producto.

Además, se ha incrementado el consumo de productos funcionales; estos productos además de sus características nutrimentales aportan otros beneficios a la salud. Es el caso de los alimentos prebióticos que utilizan fibras compuestas principalmente de oligosacáridos no digeribles en el tracto digestivo, pero que entre muchas funciones tienen las características de favorecer el crecimiento de la microbiota intestinal benéfica y de mejorar la digestión. Entre estos prebióticos se pueden mencionar la inulina de achicoria, la fibra de maíz y la fibra de nopal.

Adicionalmente, se han propuesto tendencias más sanas de conservación basadas en nuevas tecnologías como la bioconservación. Esta se basa en el uso de bacterias ácido lácticas; que tienen la capacidad de presentar una inhibición competitiva contra bacterias patógenas e incluso pueden ser productoras de compuestos antimicrobianos como bacteriocinas, ácido láctico y peróxido de hidrógeno, lo que contribuye al aumento de la vida de anaquel del

producto. Algunas bacterias ácido lácticas son además probióticas, es decir, que tienen la habilidad de desarrollarse en el tracto digestivo de los consumidores para proporcionar beneficios en la salud en el hospedero. Además, se ha reportado que existen bacterias ácido lácticas que pueden tener la habilidad de producir un exopolisacárido extracelular que podría contribuir de manera sinérgica a la viabilidad del probiótico y por tanto, a la biopreservación.

Con base en esta información, resulta muy interesante la propuesta para el diseño de nuevos productos de alimentos listos para comer, biopreservados, que se elaboren a base de carne de cerdo, y tengan menos conservadores químicos pero con la misma vida de anaquel. Además, que sean benéficos para la salud mediante la inclusión de prebióticos y bacterias ácido lácticas probióticas.



2. Marco Teórico

La industria cárnica se encuentra en una transformación vertiginosa como consecuencia de las necesidades actuales del consumidor, ya que la tendencia va orientada hacia una alimentación más saludable. La carne es un elemento clave en la dieta ya que es considerada una buena fuente de proteínas, así como de vitaminas y minerales (Olmedilla-Alonso y Jiménez-Colmenero, 2014). La Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos de los Hogares (ENIGH, INEGI, 2014), establece que los mexicanos destinan 47% de su gasto en alimentos con proteínas de origen animal.

Miranda de la Lama *et al.* (2017) reportaron que las tendencias del consumo se ven directamente influenciadas por el contenido y la calidad de la carne en los productos, lo que se traduce en cuidados desde la granja hasta la venta del producto. Se ha visto que la preferencia de consumir carne, básicamente depende de diversos factores: psicológicos por parte del consumidor, de mercado y sensoriales. Dentro de los factores sensoriales podemos mencionar la percepción de textura, color y sabor. Estos factores están relacionados con la especie, el genotipo, la nutrición, la edad, los tratamientos *ante mortem* y *post mortem* así como las condiciones de almacenamiento, y son justo estos factores los que pueden aumentar o disminuir la aceptabilidad del consumidor, y por consiguiente, la intención de pagar un precio adecuado por un producto cárnico (Font-i-Furnols y Guerrero, 2014).

La Financiera Rural (2012) reportó que se estima que los mexicanos consumen 16 kg de productos cárnicos de cerdo *per cápita* anualmente. La carne de cerdo tiene varias características interesantes en cuanto a su preferencia por los consumidores, en particular el consumo de ésta por los mexicanos va en aumento debido a su sabor y a su bajo costo. (Ngapo *et al.*, 2007). Además, se ha reportado que podría ser un gran vehículo para la inclusión de compuestos bioactivos como prebióticos, probióticos y simbióticos; adición de proteínas de origen no cárnico; enriquecimiento con minerales (selenio, calcio, hierro); incorporación de vitaminas y antioxidantes (ácido fólico, tocoferoles, carotenoides) e incorporación de otros ingredientes (nuez, esteroides vegetales, algas) (Olmedilla-Alonso y Jiménez-Colmenero, 2014).

2.1. Carne de cerdo

La porcicultura ocupa el tercer lugar en el sector pecuario. En el 2013 se produjeron 1.28 millones de toneladas de carne de cerdo con un valor de 45,372 mdp. Para el 2014 se estimaba una producción de 1.33 millones de toneladas (Financiera Rural, 2014).

Existe una oportunidad en este sector para incrementar la penetración de la producción nacional, ya que para el 2013, el consumo nacional aparente de carne de porcino se estimó en 1.9 millones de toneladas (Fig. 1), de las cuales las importaciones representan cerca del 36% (Financiera Rural, 2014).

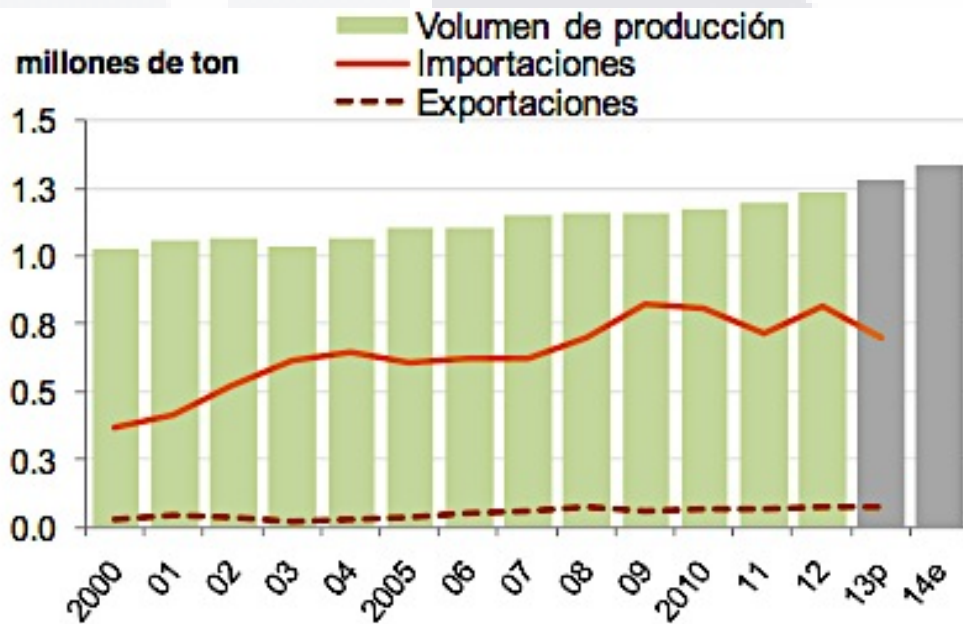


Figura 1. Producción nacional, importaciones y exportaciones de carne de cerdo (Financiera Rural, 2014).

En la Figura 2 se muestra la distribución de la producción de la carne de cerdo en el país. Los principales estados productores de carne de cerdo son Jalisco, Sonora, Puebla, Yucatán, Veracruz y Guanajuato, donde se concentra el 72% de la producción nacional (Financiera Rural, 2014).

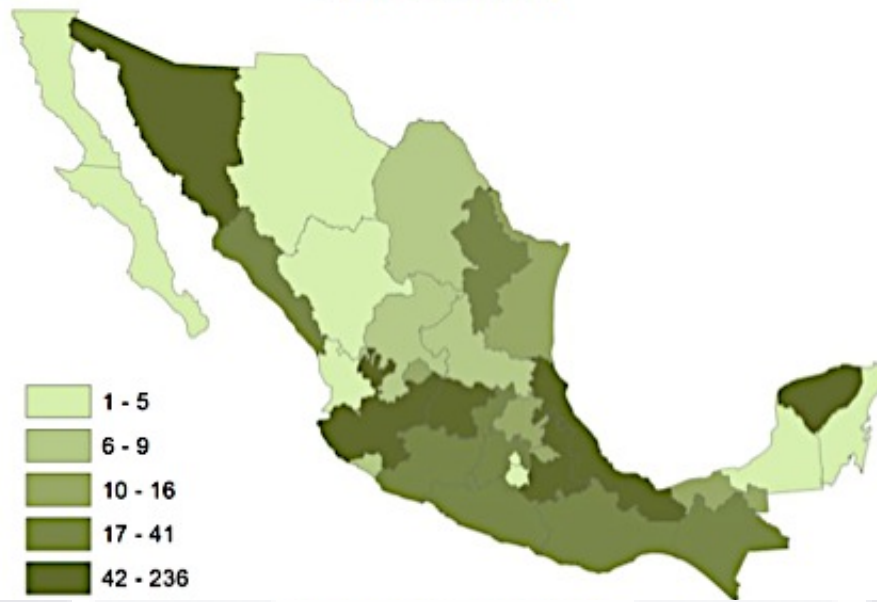


Figura 2. Volumen de producción de porcinos en 2012 en miles de toneladas (Financiera Rural, 2012).

De acuerdo con SAGARPA, la carne de porcino es la que en mayor medida se destina a la industrialización (15%), para la elaboración de carnes frías, embutidos y preparación de mantecas (Financiera Rural, 2012).

Según Díaz-Carreño *et al.* (2007), los compradores de carne de cerdo en México, pueden dividirse en tres grandes segmentos: las industrias procesadoras, los supermercados y los pequeños comercios como carnicerías, mercados públicos y el sector institucional. En nuestro país existen aproximadamente 1,000 procesadores de carne, siendo Sigma Alimentos el líder ya que produce cerca de 27% del volumen total de carnes procesadas, seguido por Zwan, Parma, Alpino y finalmente por las pequeñas empacadoras.

2.1.1. Composición e importancia nutrimental de la carne

Se ha reportado que la carne puede ser considerada como un alimento funcional debido a que está compuesta principalmente de dos macromoléculas importantes como lo son las proteínas y las grasas (Tabla 1), es buena fuente de ácido linoleico conjugado (CLA), minerales (hierro, zinc y selenio) y vitaminas (principalmente del complejo B) (Olmedilla-Alonso *et al.*, 2013; Cardoso Pereira y Baltazar Vicente, 2013).

Tabla 1. Composición química de la carne en general: pollo, res y cerdo (Cardoso-Pereira y Baltazar- Vicente, 2013)

	Composición (%)
Proteína	17- 24
Grasa	1 -32
Grasa Saturada	0.3-10.9
Vitamina B ₁₂ (mcg)	0.3-3
Fe (mg)	0.5-2.4

La carne de cerdo en particular (Tabla 2), es considerada una excelente fuente de vitaminas del complejo B (B₆ y B₁₂), fósforo, selenio, niacina, tiamina. Además de ser una fuente de potasio, zinc y riboflavina, es baja en sodio (Porkandhealth.org, 2014 a y b) y posee buen sabor. En algunos casos se ha asociado con alto contenido de grasa, sin embargo, gracias a las mejoras genéticas y a la alimentación de los animales esta característica ha cambiado; adicionalmente, es importante considerar el tipo de corte que se esta consumiendo para garantizar una carne con las características adecuadas de grasa para una dieta equilibrada (Cardoso Pereira y Baltazar Vicente, 2013; Olmedilla-Alonso *et al.*, 2013).

Tabla 2. Composición química de minerales de la carne de cerdo (Porkandhealth.org, 2014).

Nutriente	VD* (%)
Hierro	5
Magnesio	6
Fósforo	20
Potasio	11
Zinc	14
Tiamina	54
Riboflavina	19
Niacina	37
Vitamina B ₁₂	8
Vitamina B ₆ (Pirodoxina)	3

*VD= Valores Diarios Recomendados basados en una dieta de 2,000 kcal

2. 2. Alimentos Funcionales

Los alimentos funcionales son aquellos que cuando son consumidos de manera regular producen un efecto benéfico en la salud, mas allá de las propiedades nutrimentales básicas. Estos alimentos contienen diferentes cantidades y tipos de compuestos bioactivos y al ser utilizados en una formulación alimentaria con un propósito específico, el producto final es considerado como funcional (Illanes, 2015; Gil-Chávez *et al.*, 2013).

Es importante señalar que los beneficios a la salud de los nuevos productos funcionales tienen que ser demostrados para incidir sobre uno o más padecimientos. Algunos de los beneficios demostrados son: (1) decremento de los niveles de colesterol, (2) remisión en la enfermedad de Crohn, (3) alivio en la intolerancia de lactosa e (4) inhibición de las células de cáncer (Gil-Chávez *et al.*, 2013).

Un alimento funcional debe poseer tres características: (1) su efecto debe ser distinto al que posea por su carácter como nutrimento, (2) éste efecto puede ser demostrado satisfactoriamente y (3) el beneficio debe consistir en el mejoramiento de una función fisiológica o en la reducción de riesgo de desarrollar un proceso patológico (Gil-Chávez *et al.*, 2013).

Los alimentos funcionales son aquellos alimentos a los cuales han sido adicionados, modificados o eliminados algunos de sus componentes a fin de hacerlos benéficos. Estos pueden ser fortificados con vitaminas, minerales, prebióticos, fitoesteroles, ácidos grasos (omega-3) y probióticos. Otro ejemplo, es la leche deslactosada, a la cual se le ha eliminado la lactosa a través de hidrólisis enzimática (Siró *et al.*, 2008; Illanes, 2015).

Siró *et al.* (2008) reportaron que la carne y sus derivados pueden ser considerados como alimentos funcionales debido a la cantidad de compuestos bioactivos que contienen. Cabe señalar que se abre una brecha en el área de investigación, en virtud de que estos productos se pueden reformular mediante la adición de antioxidantes, prebióticos, probióticos, etc. lo que puede reorientar su consumo por los beneficios que aportan a la salud, además de su aporte nutricional.

2.2.1. Fibras y Prebióticos

Uno de los ingredientes de estos alimentos funcionales es la fibra. La **fibra** se puede considerar como un grupo de polisacáridos estructurales que no pueden ser digeridos por el hombre y que tienen una función positiva en su organismo (Valdés Martínez, 2006). Las funciones de la fibra son entre otras, la habilidad de captar el agua, por lo que aumenta el volumen de la materia fecal, y al mismo tiempo favorece los movimientos peristálticos y acelera el tránsito intestinal. Por otro lado, disminuyen el contenido de glucosa en sangre (Valdés Martínez, 2006).

La fibra puede ser clasificada de distintas maneras. Una de ellas es la que permite dividirla en dos: fibra cruda y fibra dietética. La primera, se determina mediante un tratamiento químico severo, que implica la adición de ácido sulfúrico e hidróxido de sodio. Durante este proceso, se pierden muchos polisacáridos que están incluidos en la fibra dietética, esta fibra es la que se reporta en las tablas nutrimentales (Valdés Martínez, 2006). La fibra dietética, de acuerdo a la NOM-002-SAGARPA-2016 es cualquier material comestible de origen vegetal o animal que no sea hidrolizado por las enzimas endógenas del tracto digestivo humano. Entre los componentes de la fibra dietética se encuentran los oligosacáridos no digeribles compuestos principalmente de fructosa. Se ha reportado que la fibra cruda es en muchos casos seis veces menor que la fibra dietética (Valdés Martínez, 2006).

Otra forma, de clasificar la fibra es dependiendo de su solubilidad, es decir, fibra soluble (FS) y fibra insoluble (FI). La primera forma geles o sustancias viscosas (pectinas) y la FI tiene la habilidad de formar una especie de bulto (De la Plaza *et al.*, 2013). La FAO/OMS propuso que se clasificara la fibra en no fermentable y fermentable, entendiéndose por no fermentable, aquellas moléculas que forman parte de las capas lignificadas de los granos de cereales y que pueden ligar agua en el colon, diferenciándose de la fibra fermentable en que esta puede ser utilizada como sustrato (maltodextrinas, inulina, polidextrosa, hemicelulosa) para que se desarrollen microorganismos (De la Plaza *et al.*, 2013). Estos términos pudieran estar relacionados debido a que la solubilidad de las fibras está relacionada con su capacidad de fermentación (Escudero Álvarez y González Sánchez, 2006).

La fibra puede también estimular el crecimiento, proliferación y activación de determinadas bacterias en el colon. A este tipo de fibra se le conoce como fibra prebiótica. El término **prebiótico** fue introducido por Gibson y Roberfroid en 1995, definiéndolo como “un ingrediente alimenticio no digerible que produce un efecto benéfico en el hospedero al estimular el crecimiento selectivo y/o la actividad metabólica de un número limitado de bacterias en el colon” (Sridevi *et al.*, 2014; Saad *et al.*, 2013). Estos mismos autores han actualizado su definición y ahora lo definen como “un ingrediente selectivamente fermentado que permite cambios tanto en la composición y/o en la actividad de la microbiota gastrointestinal que confiere beneficios de salud y bienestar en el hospedero”

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

(Saad *et al.*, 2013). Los prebióticos tienen determinada actividad en el hospedero dependiendo de su estructura, su peso molecular y sus ramificaciones (Blatchford *et al.*, 2013). Es importante destacar que deben existir tres aspectos claves para cumplir esta definición: (1) ser resistentes a la digestión, (2) llevar a cabo una fermentación por la flora intestinal y (3) tener un efecto para promover la salud (Sridevi *et al.*, 2014).

Los prebióticos presentan las siguientes propiedades: mantenimiento de la flora intestinal y estimulación del tránsito intestinal; cambio de la flora colónica, contribuyendo a una digestión adecuada; eliminación del exceso de los compuestos como glucosa y colesterol, favoreciendo solo la absorción de las sustancias necesitadas por el organismo; estimulación del crecimiento de bacterias ácido lácticas (BAL); estimulación de la absorción y producción de las vitaminas B (B₁, B₂, B₃, B₆, B₉, B₁₂); estimulación del sistema inmune; contribución al control de obesidad y disminución al riesgo de desarrollar osteoporosis (Sridevi *et al.*, 2014).

Para determinar el efecto de un prebiótico se desarrolló en el 2003 una técnica reportada por Palframan *et al.* (2003), donde a través de una ecuación se puede calcular un índice prebiótico (PI). Esta técnica está basada en el cambio de la densidad poblacional de grupos claves de bacterias durante la fermentación. Principalmente se analiza el desarrollo de bifidobacterias, lactobacilos, clostridia y bacteroides en un medio simple con una fuente de carbono determinada. Este índice PI permite evaluar el efecto prebiótico *in vitro*, donde se establece que cuando el resultado da un valor mayor a 1 indica que la fuente de carbono probada puede considerarse con efecto prebiótico.

Los prebióticos se utilizan en la industria de alimentos como ingredientes funcionales en bebidas (jugos de frutas, café, cacao, té, bebidas alcohólicas), en productos lácteos (productos fermentados, leche en polvo y en helado), en yogures probióticos y en productos simbióticos. Otras aplicaciones son en postres, dulces, cereales, chocolates, panes, pastas y productos cárnicos (por ejemplo, en pasta de pescado) y tofu (Sridevi *et al.*, 2014).

Existen algunas tendencias futuras para la utilización de estos alimentos, dentro de las cuales destacan la microencapsulación, microemulsión, particulación coloidal y la

nanoestructura a fin de poder llevar estos componentes activos en las dosis necesarias para proporcionar un efecto directo sobre la salud (Onwulata, 2013).

Los prebióticos que han sido utilizados en la industria, pueden ser sintetizados o extraídos de plantas y algas, y son principalmente (1) fructooligosacáridos (FOS), (2) galactooligosacáridos (GOS), (3) isomaltooligosacáridos (IMO) y (4) xylooligosacáridos (XOS) (Saad *et al.*, 2013).

El prebiótico de mayor uso es la inulina de achicoria (*Cichorium intybus*) debido a la capacidad demostrada que tienen de estimular el desarrollo de bacterias específicas en el colon, como bifidobacterias y lactobacilos. Además, de estas características prebióticas tiene propiedades de reemplazar grasa, azúcar y de servir como estabilizador en emulsiones y espumas (González-Herrera *et al.* 2015). La inulina puede ser extraída de diferentes fuentes, como la achicoria, el agave, el ajo y cebolla. Se ha reportado que la inulina se encuentra en una proporción de 22.9 g/100 g de producto crudo en algunas fuentes naturales de alimentos. En particular la forma de extracción industrial (Fig. 3) de este tipo de producto es someterlo a una separación física o hidrolizarla a través de endoinulinasas para producir oligosacáridos de cadena corta (Sridevi *et al.*, 2014).

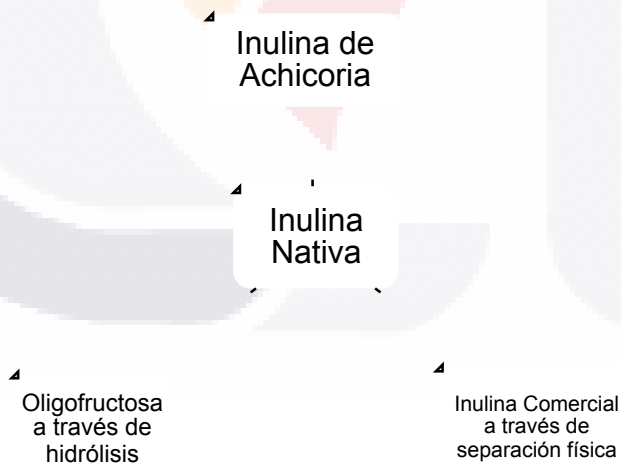


Figura 3. Producción industrial de fructooligosacáridos a través de extractos naturales. (Sridevi *et al.*, 2014).

La estructura de la inulina es básicamente una mezcla de fructooligosacáridos y glucofructooligosacáridos, como se muestra en la Figura 4.

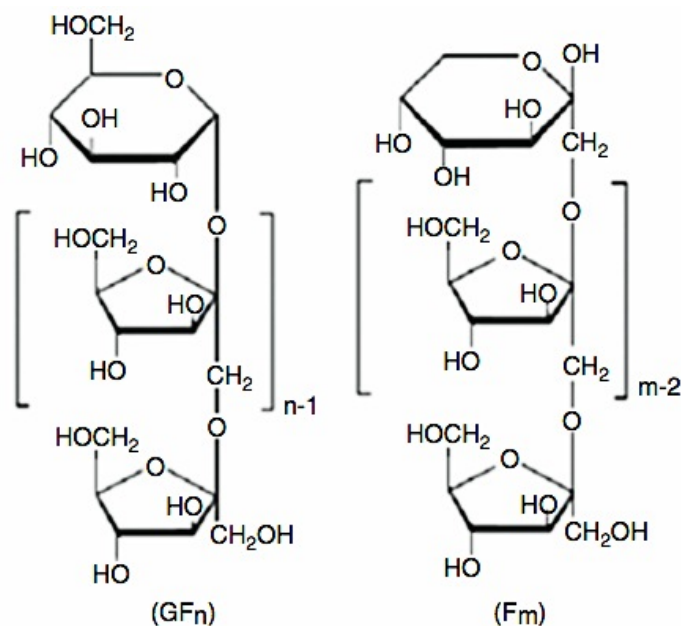


Figura 4. Estructura química de la inulina.

En el lado izquierdo se presenta el glucofructooligosacárido (Gfn) y en la derecha el fructooligosacárido (Fm) (González Herrera *et al.*, 2015).

2.2.2. Probiótico

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) un probiótico es un microorganismo vivo que cuando se ingiere en condiciones adecuadas, le confiere un efecto benéfico al hospedero (Kanmani *et al.*, 2013).

Se han reportado los beneficios del consumo de alimentos con las especies de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus casei*; ligados al control de enfermedades gastrointestinales, a través de una mejora en el metabolismo de la lactosa, en la reducción del colesterol en sangre y en la estimulación del sistema inmune (Shah *et al.*, 2010). En la Tabla 3, se observa como se ha modificado la definición de probióticos con respecto al tiempo.

Tabla 3. Cambios en la definición de probióticos (Kanmani *et al.*, 2013).

Autor/ Año	Definición
Parker, 1974	Esta fue la primera vez que se utilizó esta palabra para describir un suplemento microbiano alimenticio. Definiéndolo como un organismo y sustancia que contribuye al balance microbiano.
Fullar, 1989	Modificó la definición anterior e indicó que los probióticos son suplementos vivos microbianos, que afectan benéficamente el hospedero animal, mejorando el balance microbiano.
Havenaar y Huis int Veld, 1992	Propusieron que los probióticos son: un cultivo único o combinado de microorganismos vivos que aplicados a un animal o humano, afectan benéficamente las propiedades de la microflora endógena.

Para seleccionar nuevas cepas probióticas, se tienen que tomar en cuenta los siguientes parámetros:

1. Criterios de Seguridad Alimentaria. Anteriormente, el hecho de que fueran considerados una bacteria ácido láctica (BAL) era suficiente; sin embargo, la FAO y la OMS han propuesto una lista de criterios aplicables aún para aquellos grupos de microorganismos considerados como seguros (GRAS=Generalmente Reconocido como Seguro). Las características en esta lista incluyen que presenten resistencia a antibióticos así como una excesiva actividad metabólica principalmente en la producción de D-lactato y la desconjugación de la bilis. La principal contraindicación, está en relación con las personas inmunocomprometidas (Grattepanche y Lacroix, 2010).

Otro aspecto que debe observarse es que las alergias relacionadas con el consumo de alimentos como la leche, han aumentado en los últimos años, sobre todo tomando en cuenta que la leche y sus constituyentes son utilizados para la producción de estos probióticos, por lo que se han evaluado otros medios de cultivo para propagar estas bacterias (Grattepanche y Lacroix, 2010).

2. Propiedades Funcionales. Los probióticos deben ser evaluados desde diferentes puntos de vista: (1) en relación a su tolerancia al pH bajo a fin de simular su viabilidad en nuestro sistema digestivo (jugos pancreáticos), (2) en función de adherencia a la mucosa intestinal, (3) con base en su protección por su producción de sustancias antimicrobianas, (4) antagonismo contra patógenos, (5) por la competencia por sitios de adherencia, (6) por su interacción con tejido linfoide, (7)

inactivación de componentes dañinos dentro del contenido intestinal (interacción con las toxinas y regulación de actividad metabólica de la microbiota intestinal), (8) por su efecto trófico de la mucosa intestinal (a través de la producción del butirato) y por la normalización de la composición de la microbiota intestinal (Grattepanche y Lacroix, 2010).

Algunas de estas propiedades pueden ser evaluadas *in vitro* o utilizando sistemas un poco más complejos como modelos de fermentación colónica, para simular las interacciones de la microbiota intestinal con probióticos y patógenos. Posterior a esto, se realizan estudios *in vivo* regulados desde el punto de vista ético (Grattepanche y Lacroix, 2010).

3. Criterios Tecnológicos. La estabilidad de los probióticos durante la producción de alimentos, debido a que existen procesos severos en la industria, como son: secado, congelamiento, etc. Algunos procesos tecnológicos que pueden mejorar la estabilidad de los probióticos son la microencapsulación. Se debe además evaluar la tolerancia a pH ácido y a la exposición de oxígeno (Grattepanche y Lacroix, 2010).

En el 2010 más de 70 productos con probióticos estaban disponibles a nivel mundial, esta cantidad ha ido incrementado en los últimos años. Los productos en los cuales se ha visto la incorporación de las bacterias ácido lácticas probióticas son: leche, leche agria, yogurt, queso, jugo de frutas, helados, producto de avena, entre otros. Los japoneses se han destacado más por la innovación y desarrollo de productos probióticos (Shah *et al.*, 2010).

Los probióticos se han utilizado como tratamiento de varias enfermedades con éxito: intolerancia a la lactosa, gastroenteritis aguda, alergia alimenticia, dermatitis atópica, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide y cáncer de colon, síndrome de colón irritable y diarrea (Marco *et al.*, 2006; Saad *et al.*, 2013; Masood *et al.*, 2011).

Con relación a las perspectivas futuras de los probióticos se pueden mencionar algunos procesos tecnológicos que pueden mejorarse como la encapsulación y además se pueden perfeccionar los modelos *in vivo* de análisis (Onwulata, 2013).

2.2.2.1. Bacterias ácido lácticas productoras de exopolisacárido

Algunas bacterias ácido lácticas tienen la facultad de producir un exopolisacárido, el cual sirve como texturizante en la industria, principalmente en productos como: yogurt, queso y postres. Además, se les ha atribuido muchos beneficios como estimulador del sistema inmunológico, antimutagenicidad y actividad antitumoral. Es poco probable que la bacteria productora de exopolisacárido pueda utilizar este último como fuente de energía, sin embargo, los exopolisacáridos producidos por las bacterias ácido lácticas pueden ser considerados como prebióticos, ya que que otras bacterias ácido lácticas probióticas pueden tener la capacidad de utilizar el exopolisacárido como fuente de carbono (Harutoshi, 2013).

Se ha reportado que la fuente de carbono y nitrógeno del medio de cultivo donde crece la bacteria puede tener influencia directa sobre la cantidad y características químicas del exopolisacárido producido (Marshall *et al.*, 1995). La composición química del exopolisacárido depende de la unión de diferentes azúcares (galactosa, glucosa, ramnosa, lactosa y fructosa) y sus derivados; se ha establecido que su peso molecular puede variar de 4×10^4 a 6×10^6 Da (Mozzi *et al.*, 2003; Domínguez, 1997).

Hess *et al.* (1997), describieron un modelo bidimensional donde explican la forma en que puede estar unido el exopolisacárido con la matriz proteica del sistema y la bacteria, como se muestra en la Figura 5.

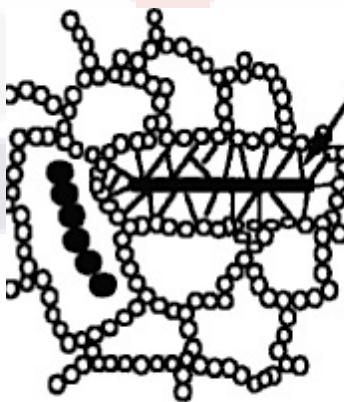


Figura 5. Modelo bidimensional de un producto lácteo fermentado por una bacteria ácido láctica productora de exopolisacárido.

La matriz proteica está representada con círculos, la bacteria productora de exopolisacárido está representada como cilindro y el exopolisacárido como hebras (Hess *et al.*, 1997).

Los estudios revelan que el exopolisacárido se produce durante la fase exponencial y cuando el sustrato se encuentra en condiciones limitantes, como ocurrió con *Bacillus coagulans* RK-02 (Kodali *et al.*, 2009). Actualmente se sabe que el exopolisacárido puede ser de dos tipos: capsular y filante. El primero tiene la habilidad de interactuar con la bacteria, mientras que el filante puede ser excretado al medio (Mozzi *et al.*, 2003).

Se ha reportado que el exopolisacárido tiene beneficios a la salud que incluyen un efecto prebiótico, antiinflamatorio, antiviral, inmunomodulador, antioxidante además que previenen la formación de biopelículas en alimentos. Los compuestos antioxidantes son importantes porque se ha demostrado que desempeñan un papel en la prevención de la inflamación crónica, la arteroesclerosis, el cáncer y los desordenes cardiacos (Kanmani *et al.*, 2013).

Las aplicaciones que se le ha dado al exopolisacárido producido por bacterias ácido lácticas, se debe principalmente a que es un producto natural que tiene varias funciones, como protección de la célula, adhesión de la bacteria a las superficies sólidas e interacciones célula-célula (Kanmani *et al.*, 2013).

Las bacterias productoras de exopolisacárido se han utilizado en productos lácteos fermentados para mejorar texturas debido a que las cepas filantes o productoras de exopolisacárido presentan mayores sitios de unión entre la matriz proteica y la bacteria, lo que da una mayor consistencia del producto y en consecuencia un aumento en la retención de agua y disminución de la sinéresis (Benezech y Maingonnat, 1993; Domínguez *et al.*, 2001; Hess *et al.*, 1997). Con esta propuesta se ha logrado disminuir el uso de aditivos, en particular de retenedores de agua, sustituyéndolos por un producto natural. El uso de bacterias filantes productoras de exopolisacárido, puede proveer funciones como agente viscoso, gelificante, y como retenedor de agua. En este sentido, existe un gran interés de ampliar su utilización en la industria de alimentos (Kanmani *et al.*, 2013).

2. 3. Biopreservación

Durante estos últimos años el desarrollo de alimentos procesados se ha orientado a la obtención de productos con un valor nutrimental elevado y que además sean una alternativa para la prevención de enfermedades y que a su vez tengan menos aditivos artificiales y posean características sensoriales adecuadas. Por tal motivo, se han buscado diferentes estrategias para cumplir con estas características. En el aspecto de la preservación de alimentos se ha planteado el uso de microorganismos benéficos (GRAS) para aumentar su vida útil (Gerbaldo *et al.*, 2012).

La biopreservación consiste en la mejora en la seguridad y calidad alimentaria al utilizar microbiota (natural o controlada) y/o sus subproductos antibacterianos, se utilizan principalmente bacterias ácido lácticas (Gálvez *et al.*, 2008; Kanmani *et al.*, 2013). De acuerdo a esta definición, la biopreservación puede darse de las siguientes maneras: (1) mediante la utilización de bacterias ácido lácticas que por crecimiento competitivo pueden desarrollarse en los medios alimentarios, no permitiendo el desarrollo de la microbiota patógena, y por otro lado, sus compuestos antimicrobianos producidos durante la fermentación de estas bacterias pueden actuar como bacteriocidas o bacteriostáticos, (2) por medio del uso de sus metabolitos como las bacteriocinas purificadas, y (3) mediante la utilización de compuestos naturales.

Para entender como este tipo de biopreservación actúa sobre la microbiota nociva de estos productos cárnicos es importante conocer a los microorganismos responsables del deterioro de los productos cárnicos y los responsables de los causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).

2.3.1. Microorganismos responsables de deterioro en productos cárnicos

Actualmente, el tema de la seguridad alimentaria ha tomado gran relevancia a nivel mundial. Para poder garantizar esta seguridad debemos minimizar las condiciones de desarrollo de microorganismos patógenos, y para ello es necesario conocer las características de crecimiento de los mismos. Como ya se ha mencionado, la carne de cerdo al poseer alto contenido de agua y una variedad de nutrientes, la convierte en un medio óptimo de crecimiento de ciertos microorganismos patógenos. En la Tabla 4, se

presentan las características de desarrollo de bacterias que predominan en carnes refrigeradas (Sun y Holley, 2012).

Tabla 4. Características de bacterias responsables de deterioro de la carne en refrigeración.

Microorganismos	Reacción a la tinción Gram	Requerimiento de oxígeno	Requerimiento de pH	Potencial de deterioro
<i>Pseudomonas</i>	Negativa	Aerobio estricto	Amplio rango	Alto
<i>Acinetobacter</i>	Negativa	Aerobio estricto	Amplio rango	Bajo
<i>Moraxella</i>	Negativa	Aerobio estricto	Amplio rango	Bajo
<i>Enterobacteriaceae</i>	Negativa	Anaerobio facultativo	No presenta crecimiento aeróbico debajo de pH 5.8	Alto
Bacterias ácido lácticas	Positiva	Anaerobio Facultativo	Amplio rango	Bajo
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Positiva	Anaerobio Facultativo	No presenta crecimiento anaeróbico debajo de pH 5.8	Alto
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Positiva	Anaerobio Facultativo	No presentan crecimiento debajo de pH 6.0	Muy alto

Tomada de: Sun y Holley (2012).

En la actualidad se han utilizado métodos de conservación para generar productos más accesibles a los consumidores. Dentro de estos podemos mencionar aquellos productos que se han denominado como listos para comer, en los que se pueden desarrollar bacterias patógenas como las que se mencionan a continuación (Thévenot *et al.*, 2006; Baer *et al.*, 2013):

1. *E. coli* 0157:H7. A partir de la presencia de este microorganismo en carne, se estableció en EUA que la utilización del sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (HACCP) fuera obligatorio. Generalmente se manifiesta con diarreas sanguinolentas y sin atención apropiada puede causar la muerte en pocas horas.
2. *Listeria monocytogenes*. Se da en productos listos para comer (ready-to-eat) por contaminación cruzada. La infección puede dar como resultado meningitis y abortos. *L. monocytogenes* es la bacteria que en los últimos años ha causado más muertes en la industria de alimentos, sobre todo en productos de cerdo listos para comer.
3. *Salmonella*. Es la principal causa de enfermedades gastrointestinales a nivel mundial, generalmente se encuentra en los intestinos y las heces de los animales.

4. *Staphylococcus aureus*. Produce una toxina termorresistente.
5. *Campylobacter*. Es la principal causa de diarrea en los EUA, debido a la presencia de una toxina termorresistente.

Se han reportado estudios relacionados con los microorganismos que causan deterioro en productos marinados. En Noruega se realizó un estudio donde se caracterizó a la microbiota presente en los productos marinados de cerdo. Se observó que al final de la vida de anaquel predominaban algunas cepas de *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Carnobacterium*. Se realizó además un estudio de vida de anaquel, donde se estableció que el olor desagradable relacionado con este tipo de productos puede ser dado por *Lactobacillus algidus* (Schirmer *et al.*, 2009).

2.3.2. Bacterias ácido lácticas como cultivos bioprotectores

Se ha reportado que las bacterias ácido lácticas, pueden ser utilizadas como cultivos bioprotectores en la industria ya que son capaces de inhibir patógenos mediante competencia directa con ellos, además de que producen compuestos antimicrobianos que mejoran la estabilidad química y microbiológica, y en consecuencia alargan la vida de anaquel. Por otro lado, pueden mejorar el perfil sensorial de los alimentos haciéndolos más agradables al paladar (Bassi *et al.*, 2009).

Las bacterias ácido lácticas probablemente sean el grupo de bacterias mas abundante y difundidas en la naturaleza, debido a la capacidad que poseen de crecer en una gran variedad de sustratos y en diversas condiciones biológicas (Parra Huerta, 2010; Gänzle y Gobetti, 2013).

Dentro de las BAL, el género *Lactobacillus* es el más importante y heterogéneo, incluyendo especies con propiedades bioquímicas y fisiológicas muy diferentes. Las BAL son generalmente reconocidas como seguras (GRAS) y desempeñan un papel importante en la conservación de alimentos, ya sea en la microbiota natural o en cultivos iniciadores añadidos bajo condiciones controladas (Aymerich y Hugas, 1998, citado por Quintero-Salazar, 2001). Pueden utilizar distintas rutas metabólicas que tienen efecto directo en la conservación del producto y por ende en su vida de anaquel (Gänzle, 2015).

Algunos aspectos que deben ser tomados en consideración al utilizar bacterias ácido lácticas a nivel comercial son la: (1) termosensibilidad de las bacterias utilizadas, (2) cantidad y tipo de inóculo e (3) interacción entre el cultivo bioprotector y microorganismos patógenos (Rodgers *et al.*, 2002) .

2.3.3. Compuestos antimicrobianos producidos por bacterias ácido lácticas

Los principales compuestos antimicrobianos de las bacterias lácticas relacionados con la estabilidad de almacén e inocuidad son: ácidos orgánicos (láctico y acético), peróxido de hidrógeno y bacteriocinas. En la Tabla 5 se mencionan los compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias ácido lácticas y el mecanismo antimicrobiano que presentan contra las bacterias patógenas. Adicionalmente, pueden desarrollarse otros compuestos químicos como el diacetilo (Gerbaldo *et al.*, 2012; Pérez-Chabela y Ramírez-Chavarín, 2007).

Tabla 5. Compuestos producidos por bacterias ácido lácticas y su mecanismo antimicrobiano. (Wang y Wang 2014; Ouwenhand y Vesterlund, 2004; Gutiérrez-Merino, 2006)

Compuestos producidos por BAL	Mecanismo antimicrobiano
Ácidos orgánicos	Los ácidos tienen influencia sobre el gradiente de pH de la membrana y disminuyen la cantidad de energía que las células utilizan para crecer.
Peróxido de hidrógeno	Las bacterias ácido lácticas no son capaces de producir catalasa. Por lo tanto, son incapaces de degradar peróxido de hidrógeno. Al acumularse, oxidan la membrana lipídica de los microorganismos patógenos, lo que impide que se lleve a cabo la glucólisis.
Bacteriocinas	Las bacteriocinas interactúan con la membrana insertándose en ellas y pueden formar poros, entre otros mecanismos, lo que afecta la integridad de la membrana y causa un colapso en la misma.

2.3.3.1. Ácido Láctico

De acuerdo a Vásquez *et al.* (2009), la reducción de pH a causa de los ácidos orgánicos producidos es el principal mecanismo de antagonismo microbiano de estas bacterias para lograr la estabilidad del producto, complementándose con la actividad inhibidora de los ácidos orgánicos.

El mecanismo de inhibición de los ácidos orgánicos se basa en que el ácido láctico en forma no disociada puede atravesar la membrana celular y disociarse en el citoplasma, del

tal forma que puede interferir en funciones celulares, como la traslocación del sustrato y la fosforilación oxidativa (Reis *et al.*, 2012; Gänzle y Gobetti, 2013; Kanmani *et al.*, 2013).

Las bacterias ácido lácticas tienen la capacidad de producir el ácido láctico durante los procesos de fermentación. El ácido láctico ha sido considerado uno de los conservadores más antiguos, debido a que reduce el pH del medio. La acción antimicrobiana del ácido láctico se observa cuando las concentraciones son superiores a 0.5% y se ha visto su eficacia principalmente frente a bacterias anaeróbicas. Se ha utilizado el ácido láctico y lactatos para conservar la carne y sus productos embutidos (Lück y Jager, 1999). Adicionalmente, se observa que niveles altos de ácido láctico contribuyen considerablemente en la formación de sabor y por lo tanto tienen un efecto positivo en las características sensoriales del producto, además de sus características biopreservantes (Kanmani *et al.*, 2013).

2.3.3.2. Peróxido de Hidrógeno

Las bacterias lácticas producen peróxido de hidrógeno que se forma como producto terminal oxidativo de la descomposición aeróbica de los azúcares. El azúcar se oxida hasta lactato y posteriormente hasta el peróxido de hidrógeno. Lo anterior, como mecanismo de protección frente al oxígeno mediante la acción de oxidasas a NADH peroxidasas. El peróxido de hidrógeno se acumula en el medio, debido a que las BAL no poseen la enzima catalasa, y a que son microaerófilas o anaeróbicas facultativas. El peróxido de hidrógeno, es tóxico para las bacterias y provoca su muerte, debido a que el efecto es altamente oxidante, mediante la peroxidación de los lípidos de la membrana, lo cual genera cambios irreversibles en la membrana celular (Ouwenhand y Vesterlund, 2004).

El adicionar el peróxido de hidrógeno en el alimento ya no es recomendable, debido a que puede reaccionar como agente oxidante con algunos constituyentes de los alimentos, en particular con las vitaminas. Su forma de acción es cuando las enzimas, que forman parte de la membrana citoplasmática de los microorganismos patógenos, son oxidadas de manera inespecífica y por ende inactivadas (Lück y Jager, 1999).

2.3.3.3. Bacteriocinas y péptidos

Las bacterias lácticas producen bacteriocinas definidas como pequeños péptidos que tienen un peso de hasta de 80 kDa y son sintetizadas en el ribosoma. Generalmente son codificadas mediante plásmidos, facilitando la manipulación genética. Su característica principal es que exhiben un gran espectro de actividad inhibitoria sobre bacterias patógenas, ya que su forma de acción es sobre la membrana citoplasmática. La forma de acción es que estos péptidos penetran la membrana citoplasmática a través de poros que generan en la misma y destruyen por tanto su integridad, entre otros mecanismos de acción reportados (Gutiérrez-Merino, 2006; Kanmani *et al.*, 2013; Hammami *et al.*, 2010).

Es importante mencionar que no existe un impedimento toxicológico para el uso de bacteriocinas ya que han sido consumidas desde tiempos ancestrales sin efectos secundarios adversos (Mossel *et al.*, 2006). Al ser péptidos pueden ser digeridas por proteasas en el tracto digestivo humano, inactivándose. El descubrimiento de nuevas bacteriocinas, puede ser un campo muy amplio de aplicación de estos productos biológicos representado una alternativa para la biopreservación y obtención de alimentos seguros para el consumidor (Mondragón Preciado *et al.*, 2013).

Las bacteriocinas que se adicionan en alimentos deben cumplir con los siguientes requisitos: ser producidas por bacterias de grado alimentario, de preferencia ser termorresistentes, tener actividad inhibitoria contra bacterias alterantes o patógenas, no presentar riesgo a la salud humana, su adición no debe afectar las propiedades sensoriales, no deben ser adicionadas en concentraciones superiores a las que podrían generarse de manera natural, deben poseer actividad específica y solo actuar contra determinadas bacterias alterantes o patógenas (Ruíz-Larrea *et al.*, 2007; Kanmani *et al.*, 2013).

Ahora bien, para que las bacteriocinas tengan un efecto en el aumento de la vida de anaquel de un alimento, deberán cumplir con lo siguiente: (1) extender su vida de anaquel y protegerlo contra condiciones de abuso de temperatura, (2) reducir el riesgo de la transmisión de microorganismos patógenos, prevenir el deterioro del alimento y minimizar la utilización de conservadores químicos, (3) permitir el uso de tratamientos térmicos menos severos sin comprometer la seguridad alimentaria así como el mercadeo de

productos innovadores con menos acidez, más actividad de agua y menos contenido de sal (Kanmani *et al.*, 2013).

Las bacteriocinas pueden ser empleadas en alimentos de tres maneras distintas, según Ruíz-Larrea *et al.* (2007): (1) con cultivos iniciadores vivos, de modo que las bacteriocinas se producen *in situ*, (2) purificadas o semipurificadas como aditivo alimentario, (3) como un ingrediente contenido en un extracto con la cepa productora.

Se han utilizado bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas, como cultivos protectores contra *L. monocytogenes* y otras bacterias deterioradoras en carnes y pescados. Este tipo de aplicación que consiste en agregar el cultivo de BAL que producirán las bacteriocinas de forma directa en el alimento, se le denomina *in situ* (Vásquez *et al.*, 2009).

McMullen y Stiles (1996) reportaron que para seleccionar una bacteria láctica productora de bacteriocinas en carne, debe presentar las siguientes características: psicrótrofa, segura y que el etapa de de producción estuviera relacionada con su crecimiento, que las bacteriocinas permanezcan activas y estables en el ambiente cárnico, que presente actividad bactericida y que los cambios sensoriales sean mínimos o imperceptibles.

Existen varios productos comercializados por Dupont a través de Danisco, entre los que podemos mencionar a NovaGard®. Otros productos comerciales son MicroGard®, Natamex ® y Nisaplin ® (Snyder y Worobo, 2014). Para potenciar el resultado de las bacteriocinas, se realizan mezclas de las mismas, para que los microorganismos a inhibir no desarrollen resistencia (Mondragón Preciado *et al.*, 2013).

2. 4. Antimicrobianos Naturales

Los diseñadores de productos listos para su consumo tienden a evitar el uso de conservadores químicos y optan por los conservadores naturales. Los ingredientes presentes en una formulación básica de marinada que comúnmente se clasifican como saborizantes, fungen también como antimicrobianos y antioxidantes naturales, siendo las plantas y las especias las utilizadas en el área de procesamiento de alimentos.

Las especies contienen acción antimicrobiana debido a compuestos como aldehídos, ácidos orgánicos, fenoles y aceites esenciales (Lück y Jager, 1999). Se ha reportado que podría promoverse un efecto sinérgico al utilizar una mezcla de conservadores sintéticos con naturales.

Actualmente, en la industria se han utilizado, extractos de determinadas plantas como el extracto de romero, el cual es extraído con una tecnología de CO₂, conservando los diterpenos fenólicos, el ácido carnósico y el α -tocoferol (Palanca *et al.*, 2006). Se han observado, algunos otros beneficios de utilizar romero son sus efectos antioxidantes que protegen a los lípidos bioactivos (Chen *et al.*, 2013) y sus efectos antimicrobianos (Embuscado, 2015). La ventaja de la utilización del romero es su baja intensidad de sabor, retarda el inicio de rancidez y pérdida de color, y por ende extiende la vida de anaquel (San Martín-González, 2015). Chinprahast *et al.* (2012) reportaron que su uso en empanadas tipo tailandés disminuye la oxidación al utilizar romero en la formulación. Gibis y Weiss (2012) usaron extractos de uva y/o extractos de romero en empanadas fritas de carne; observando que los extractos de uva tenían el doble de actividad antioxidante al compararlos con los extractos de romero. Zhang *et al.* (2016) evaluaron la presencia de clavos y romero, observando que la combinación de ambos se recomienda para evitar el crecimiento microbiano y la oxidación de lípidos. Ghalfi *et al.* (2007), realizó un estudio donde utilizó la combinación de una suspensión de bacteriocinas con aceites esenciales obtenidos de orégano, clavo, cilantro, tomillo y romero en carne de cerdo para mejorar la seguridad y estabilidad al inhibir *Listeria monocytogenes*.

La cebolla (*Allium cepa*) y el ajo (*Allium sativum*) son de los primeros sistemas antimicrobianos descritos, en la inhibición del crecimiento y la producción de toxinas de diversos microorganismos como *B. cereus*, *Clostridium botulinum* tipo A, *E. coli*, *Lactobacillus plantarum*, *Salmonella*, *Shigella* y *S. aureus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* y *Trichosporon* (Davidson *et al.* 2013). El componente antimicrobiano del ajo es la alicina, formada por la acción de la enzima alinasa sobre la alina. Esta reacción ocurre cuando las células han sido dañadas. Una reacción similar ocurre en la cebolla. Se ha demostrado por tanto que la alicina tiene efecto inhibitorio de microorganismos en la carne y las salchichas

(Davidson *et al.*, 2013). Kim *et al.* (2010) demostraron que tanto el ajo como la cebolla evitan la decoloración en carne debido a su contenido de flavonoides. Se ha demostrado también su capacidad bacteriostática (Chen *et al.*, 2013; Davidson *et al.*, 2013). Cao *et al.* (2013) reportaron que al combinar cebolla, gengibre y quitosano, se aumentó la vida de anaquel de 5-6 días en un producto estofado de cerdo refrigerado, en el que también se puso en evidencia sus efectos como antioxidante y antibacteriano, propiedades funcionales deseables en un alimento cárnico preparado.

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es una planta que contiene polifenoles, flavonoides, vitaminas, fibra y antocianinas con actividad antioxidante (Medina-Carrillo *et al.*, 2013; Da-Costa-Rocha *et al.*, 2014). Gao *et al.* 2014 usaron el extracto de jamaica en combinación con nisina para extender la vida de anaquel en pescado durante la refrigeración, con buenos resultados.

2.5. Desarrollo de productos cárnicos marinados

La técnica de marinado data de la Edad Media, y se utiliza desde entonces para transferir sabor al producto y para aumentar su vida útil. Se ha demostrado que mediante una inmersión en salmueras se puede incrementar la vida útil del producto hasta en un 12%.

La norma que define los marinados en nuestro país es la NOM-213-SSA1-2002. Las marinadas están compuestas por los siguientes ingredientes (Lück y Jager, 1999, Bekarem, 2013, Gil-Chávez, 2013):

1. Adición de fosfatos: estabilizan emulsiones, acidifican, alcalinizan o presentan un efecto amortiguador, retienen humedad, estabilizan color, y actúan como bactericidas. Las proteínas miofibrilares, tienen la capacidad de retener agua, debido a la interacción con fosfatos en especial con el pirofosfato (Valdés Martínez, 2006). Jarvis *et al.* (2012) y McMurtrie *et al.* (2012) realizaron estudios en pollo y res, reportaron que en los productos naturales se puede minimizar el uso de fosfatos en la formulación de marinadas.

2. Antioxidantes: previenen la oxidación de grasas, evitando la aparición de olores y sabores rancios, evitan la alteración de color y textura. Como ejemplos se pueden mencionar: ascorbato de sodio, eritorbato de sodio y ácido ascórbico.
3. Especies y condimentos: Generalmente son mezclas de aceites esenciales y oleorresinas de distintas especies naturales. Tienen la capacidad de aumentar la vida de anaquel. Como ejemplos podemos mencionar: chile, cebolla, romero, etc. Algunos ingredientes alimenticios con poder bioactivo han sido considerados generalmente reconocido como seguros (GRAS) por la Agencia de Alimentos y Drogas de Estados Unidos (FDA) y se les ha dado el status de funcionales. Entre ellos podemos mencionar aceites vegetales, lactoferrina, aceite de pescado concentrado, aceite de atún, diacilglicerol y polifenoles.
4. Potenciadores de sabor: Son agentes químicos que acentúan un sabor en especial, sin modificar el sabor global. Como ejemplo, podemos mencionar el glutamato de sodio y sal. Como substitutos de sal, se han utilizados ingredientes como la transglutaminasa, cloruro de potasio (KCl), fibra dietética y caseinatos (Sun, 2009).
5. Retenedores: Aumentan la retención de agua, sirven también como emulsificante. Ejemplos de esto son las proteínas, fibras (avena y soya) e hidrocoloides (carrageninas, gomas, etc.). Se ha observado que la fibra es adecuada para incluirla en los productos cárnicos, puesto que ha sido previamente utilizada para incrementar el rendimiento durante la cocción, debido a las propiedades de ligazón entre el agua y grasa, así como para mejorar la textura (Ospina *et al.*, s.f).

2.5.1. Técnica de Cocción *Sous Vide*

En la búsqueda de diferentes técnicas de cocción para que los consumidores puedan obtener mejores características sensoriales en los productos, se ha aplicado la técnica conocida como *Sous Vide*, tratamiento que se ha utilizado desde el siglo XIX. Se empezó a practicar por los Chefs en los mejores restaurantes del mundo desde 1970; pero se hizo popular a partir del año 2010 (Baldwin, 2012).

La técnica *Sous Vide* difiere de los métodos tradicionales de cocción ya que consiste en someter alimentos crudos en una bolsa termoestable sellada al vacío bajo temperaturas controladas por un tiempo determinado. Para la carne de cerdo se establece una temperatura de 75 a los 80°C seguido de un enfriamiento rápido (Baldwin, 2012; Del Pulgar, 2013) y almacenamiento a bajas temperaturas 0-3 °C (Sebastiá *et al.*, 2010). Para ello se necesita de una selladora al vacío, bolsas termosellables, un equipo de baño maría u horno de *Sous Vide* y un circulador de inmersión (O'Brien, 2013).

El empaquetado al vacío tiene varios beneficios: (1) permite una transferencia de calor adecuada de la fuente de calor al alimento, (2) aumenta la vida de anaquel, ya que evita la recontaminación de alimentos durante el almacenaje, (3) inhibe la formación de aromas desagradables provenientes de la oxidación y (4) evita la pérdida de agua por evaporación durante la cocción (Baldwin, 2012).

El control preciso de la temperatura utilizado en esta técnica proporciona las siguientes características: (1) la reproducibilidad entre lotes es casi igual, (2) el punto de cocción puede ser evaluado para encontrar el término ideal, (3) la comida se pasteuriza y luego se enfría aumentando la seguridad alimentaria, (4) el uso de esta técnica permite convertir los cortes más duros en productos más suaves (Baldwin, 2012).

Con esta técnica se obtienen productos de suavidad y humedad muy superior a la encontrada por otros tipos de cocción usados a nivel industrial. Esto debido a que el colágeno que es duro e insoluble se convierte en una gelatina soluble por el contacto prolongado en agua caliente. Además, debido a que las proteínas se coagulan ligeramente, debido a la baja temperatura empleada (debajo del punto de ebullición), las proteínas se vuelven más digestibles (Fox y Cameron, 2009).

Otras ventajas del uso de esta técnica de cocción son la retención del valor nutricional, color y sabor, así como el mantenimiento de la calidad microbiológica por mayores períodos en comparación con otras técnicas de cocción (Sebastiá *et al.*, 2010).

La técnica de cocción *Sous Vide* es ideal para alimentos con marinadas o salsas, porque no necesitan tanto líquido como cuando se cocinan por métodos convencionales (Deveau, 2011). La tecnología de bioconservación debe combinar refrigeración a 4°C y empaquetado

al vacío para ser viable, como se menciona en el trabajo realizado por Nissen *et al.* (2002), donde analizaron 24 productos listos para comer disponibles en el mercado y preparados mediante esta técnica de *Sous Vide*. Se ha visto que solo cuando existe un abuso en la temperatura de almacenamiento la microbiota aumenta. Es importante destacar que estos autores relacionan sus resultados con las evaluaciones de seguridad alimentaria establecidas por el sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (HACCP), y señalaron que la única desventaja del uso de esta tecnología es que se requiere estandarizar para cada producto.

Se debe tomar en consideración al utilizar esta técnica que aumenta el peligro de presencia de microbiota de psicrótofos patógenos. La refrigeración prolongada a 3°C disminuye la presencia de microorganismos; pero si se mantienen a temperaturas de almacenamiento mayores de 10 a 12° C, que es lo que ocurre en las vitrinas de exposición de los supermercados, el número de bacterias capaces de desarrollarse aumentaría drásticamente, como para el caso de *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* (Forsythe y Hayes, 2012). Por tal motivo, es muy importante considerar el tamaño del corte para poder establecer el tiempo y temperatura adecuada para lograr las mejores características microbiológicas y sensoriales del producto (Baldwin, 2012).

2.5.2. Análisis sensorial como herramienta de calidad y del desarrollo de alimentos.

La aceptación de un producto desde su punto de vista sensorial es uno de los factores más importantes para la decisión de compra de un producto. Es por tal motivo que se requiere establecer pruebas especializadas que nos ayuden a detectar los gustos y preferencias de los consumidores.

Se han reportado estudios donde se evaluaron productos cárnicos marinados y sus ingredientes mediante técnicas sensoriales. Por ejemplo, Díaz *et al.* (2008), establecieron que al evaluar carne de cerdo procesado por el método *sous-vide* las pruebas sensoriales eran más contundentes que al comparar los resultados microbiológicos y fisicoquímicos. Por otro lado, Kim *et al.* (2010) han evaluado la utilización de distintos ingredientes en las marinadas (ajo y cebolla en distintas concentraciones) mediante una escala hedónica donde califican la aceptabilidad del producto. Meadus *et al.* (2013), inyectaron aceite DHA para

evitar deterioro por oxidación y mediante pruebas de análisis sensorial detectaron las diferencias entre ellas. Otro estudio semejante, fue el desarrollado por Quelhas *et al.* (2010), donde se utilizó té verde para evitar el deterioro del producto marinado.

En el desarrollo de alimentos se utilizan algunas de las siguientes pruebas aplicadas a los consumidores que nos permiten evaluar que tan bien posicionado podría estar nuestro producto:

1. **Justamente correcto (JAR):** Estas pruebas se emplean en los consumidores para identificar si la intensidad de un atributo esta por debajo o por arriba de lo esperado. Por ejemplo, para determinar la preferencia de los consumidores en cuanto al nivel de azucar en una bebida, se les pide que lo evalúen en una escala de "muy alta" y de "muy baja". Las respuestas del consumidor pueden ser un indicador para mejorar el prototipo y sugerir la forma en la que esta deba reformularse. La información JAR, generalmente esta sintetizada en el porcentaje de respuestas que se han seleccionado de cada grupo de la escala establecida. Por ejemplo, muchas compañías consideran que si se obtiene el 75% de evaluación de justamente correcto, en una escala de 5 puntos el producto es adecuado para lanzarlo al mercado (Lawless, 2013).
2. Este análisis va acompañado de otro tipo de pruebas conocidas como **pruebas de penalidades (penalty)**. Las cuales relacionan la aceptación en general del producto y lo comparan con cada uno de los atributos analizados. Este método nos ayuda a identificar las modificaciones que se pueden realizar en el producto, mejorando la aceptación general del mismo (Popper, 2014; Gacula *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2014).
3. **Técnica de Análisis de Segmentación (LSA**, por sus siglas en inglés que vienen de Landscape Segmentation Analysis), se basa en evaluar el gusto de los consumidores mediante la evaluación de distintos atributos en productos. Esta metodología representa especialmente las diferencias descritas por las características sensoriales que han sido evaluadas por consumidores. En este espacio se encuentra “el producto ideal”, por lo tanto se considera una herramienta para conocer el grado de gusto de cada producto. El fundamento de esta técnica se basa en usar escalas de gusto que se

representan en un mapa de productos, donde cada consumidor tiene su propia distribución. En este mapa es posible identificar grupos de consumidores que comparten localizaciones similares, representándose como zonas densas u oscuras, por lo que identifican y definen los gustos de todos los consumidores, y son ideales ya que pueden formar lo que generalmente describimos como segmentos del mercado, que pueden estar basados en edad, sexo y tipo de consumo entre otras variables (Rousseau *et al.*, 2012; Ennis *et al.*, 2013).

4. **Análisis de identificación de los atributos presentes** en un alimento (CATA, Check all that apply), que es una herramienta que nos sirve para detectar los atributos positivos y negativos en los productos evaluados, esta prueba consiste en que los consumidores marquen los atributos que detectan. La prueba CATA puede ser utilizada como una alternativa de JAR. Ares *et al.* (2017) estableció que las escalas JAR pueden distinguir diferencias de una manera más significativa con relación a un óptimo al compararlas con la prueba CATA. Sin embargo, es importante mencionar que en la industria de alimentos, las pruebas CATA están siendo utilizadas con mayor frecuencia, se han reportado diferentes formas de análisis de estos datos a fin de poder establecer un perfil de consumidor (Jaeger *et al.*, 2014; Meyners *et al.*, 2013).

2.5.3. Vida de Anaquel

Un parámetro que se debe establecer en los productos que se encuentran en el mercado es la vida de anaquel, ya que este será un factor determinante para comercializarlo. La vida de anaquel puede definirse de varias maneras, una de ellas es como una función de las condiciones ambientales durante las cuales es almacenado un producto, como de la magnitud en cambios de calidad permitida durante el tiempo requerido para alcanzar los anaqueles de las alacenas de los consumidores. Otra definición, es el tiempo que le toma a un producto en deteriorarse hasta un grado inaceptable bajo condiciones específicas de almacenamiento, procesamiento y empaque. Los tipos de vida de anaquel son tres: microbiológico, fisicoquímico y sensorial (San Martín-González, 2015).

La vida de anaquel significa el período durante el cual un producto cumple con las siguientes características: es seguro (inocuo), garantiza que mantiene las características sensoriales, químicas, físicas y microbiológicas deseadas, cumple con las declaraciones nutrimentales. Todo lo anterior, siempre y cuando se almacene bajo las condiciones recomendadas.

Los factores que afectan la vida de anaquel pueden ser (San Martín-González, 2015):

1. Intrínsecos: actividad de agua (A_w), pH, acidez total, potencial redox (Eh), oxígeno disponible, nutrientes, microflora nativa, bioquímica de las formulaciones (enzimas, reactantes) y conservadores (sal, etc.).
2. Extrínsecos: perfil tiempo-temperatura durante el procesado, control de temperatura durante el almacenamiento y distribución, humedad relativa, exposición a la luz (UV, IR), conteos microbianos en el ambiente, composición de la atmósfera en el empaque, tratamiento térmico post-proceso y manejo por parte del consumidor.
3. Factores de procesado: tratamiento térmico, congelación y empaque.
4. Factores implícitos: atributos fisiológicos de los microorganismos (velocidad de crecimiento específico) e interacción entre microorganismos (presencia de microbiota competitiva).
5. Dentro de los factores intrínsecos se deben contemplar: materias primas, estructura y composición de la matriz alimentaria, formulación del alimento y tecnologías de barrera utilizados.

Determinar los criterios adecuados de vida de anaquel, resulta ser muy complejo, ya que para cada producto se debe determinar las características que tienen más peso sobre la pérdida de propiedades del producto. A continuación se presentan algunos de los criterios seleccionados para evaluar la vida de anaquel: (1) evaluación de los cambios microbiológicos; dentro de los cuales podemos mencionar, cuenta total en placa, cuenta de psicrófilos, cuenta de microorganismos específicos que sean indicadores de salud pública o de significancia económica. (2) cambios nutrimentales; la pérdida de nutrientes como vitamina C u otro componente que sea relevante dentro de la estructura y composición del

alimento, (3) pérdida o cambio de alguna de sus propiedades; color, humedad o producción de olores desagradables, (4) cambios en propiedades funcionales; como por ejemplo, la habilidad de formar espumas, sabores, etc. (5) cambios de textura no deseables (Fuller, 2011).

La vida de anaquel dependiendo de la temperatura en la que son almacenados los alimentos se clasifican en: (1) refrigeración: percederos (1 a 14 d) y los de vida extendida bajo refrigeración (60 a 90 d), (2) ambiente: semi-percederos (menor a 6 meses) y los estables (6 meses a 3 años) (Labuza (1982); Labuza y Altunakar (2007) citado por San Martín-González (2015)).

Sin embargo, para evaluar las condiciones de vida de anaquel, deben seleccionarse las temperaturas de exhibición del producto, transporte, almacenaje, etc. Por ello se desarrollaron tres tipos de aproximaciones: (1) pruebas estáticas, desarrolladas a una temperatura determinada, (2) pruebas de vida acelerada, las cuales son preferidas por la mayoría de los investigadores y se realiza una cinética del deterioro del producto, para este tipo de pruebas se utiliza la ecuación de Arrhenius y (3) pruebas de abuso de temperaturas del producto (Fuller, 2011).

En el mercado se manejan dos conceptos de suma importancia que están relacionados con vida de anaquel, los cuales se definen a continuación.

1. La fecha de caducidad, se puede definir, como la fecha límite en que se considera que las características sanitarias y de calidad son óptimas para el consumo de un producto almacenado en las condiciones sugeridas por el responsable del mismo.
2. La fecha de consumo preferente, es la fecha en que bajo determinadas condiciones de almacenamiento expira el período durante el cual el producto es comercializable y mantiene las cualidades específicas que se le atribuyen tácita o explícitamente, pero después de la cual el producto preenvasado puede ser consumido. La fecha de caducidad y de consumo preferente, se rigen en nuestro país por la NOM-051-SCFI/SSA1-2010.

2.5.3.1. Vida de Anaquel en Carne

Es importante considerar que actualmente en la industria de alimentos, las pérdidas de producto de carne fresco, pueden representar hasta el 40% del total de la producción (Sun y Holley, 2012). Como se ha descrito, la vida de anaquel en carne puede estar determinada por tres factores principalmente: microbiológicos, fisicoquímicos y sensoriales.

La vida de anaquel de carne empacada está determinada principalmente por la actividad de los microorganismos, que resulta en el desarrollo de olores desagradables, producción de gas y de una biopelícula. En algunos casos también está influenciado por la oxidación y los cambios en la pigmentación de la carne que modifica su sabor (Sun y Holley, 2012).

Uno de los factores determinantes en la calidad de la carne, durante el procesamiento y el almacenamiento, es el cambio en color. Estos cambios en los pigmentos, algunos de los cuales son irreversibles, se afectan por el oxígeno, la acidez de la carne y la exposición a la luz; la combinación de estos factores determina qué pigmentos serán dominantes. Dentro, de los cambios normales de la carne, el color de la misma no es indicativa del estado sanitario o nutrimental, pero es un parámetro utilizado por los consumidores para determinar la compra del producto (Potter y Hotchkiss, 2007).

2.6. Productos marinados bioconservados

Con relación a la bioconservación, se han utilizado diversas bacterias ácido lácticas como cultivos protectores, además, de sus productos de fermentación como las bacteriocinas (Vásquez *et al.*, 2009), un resumen de estos estudios se presenta en la Tabla 6. Como puede observarse, la mayoría de los estudios que han utilizado la biopreservación han reportado la inclusión de bacterias ácido lácticas y/o bacteriocinas, principalmente en pescado y mariscos. En la mayoría de los casos cuando se utilizó el cultivo láctico *in situ* se observó un aumento en la vida de anaquel.

En la actualidad, no existen estudios realizados en productos cárnicos de cerdos marinados listos para comer preparados mediante la técnica de *Sous Vide* con la inclusión de prebióticos que sean bioconservados, haciendo necesaria una investigación en este sentido. Como se ha discutido anteriormente, la carne de cerdo en nuestro país es un producto con

características sensoriales únicas, además de ser una proteína de bajo costo. Por otro lado, gracias a sus mejoras genéticas y de alimentación, el cerdo es un producto con menor contenido de grasa y con propiedades nutrimentales interesantes. Lo anterior lo convierte en una matriz biológica adecuada para ser usado en la inclusión de prebióticos y bacterias ácido lácticas.

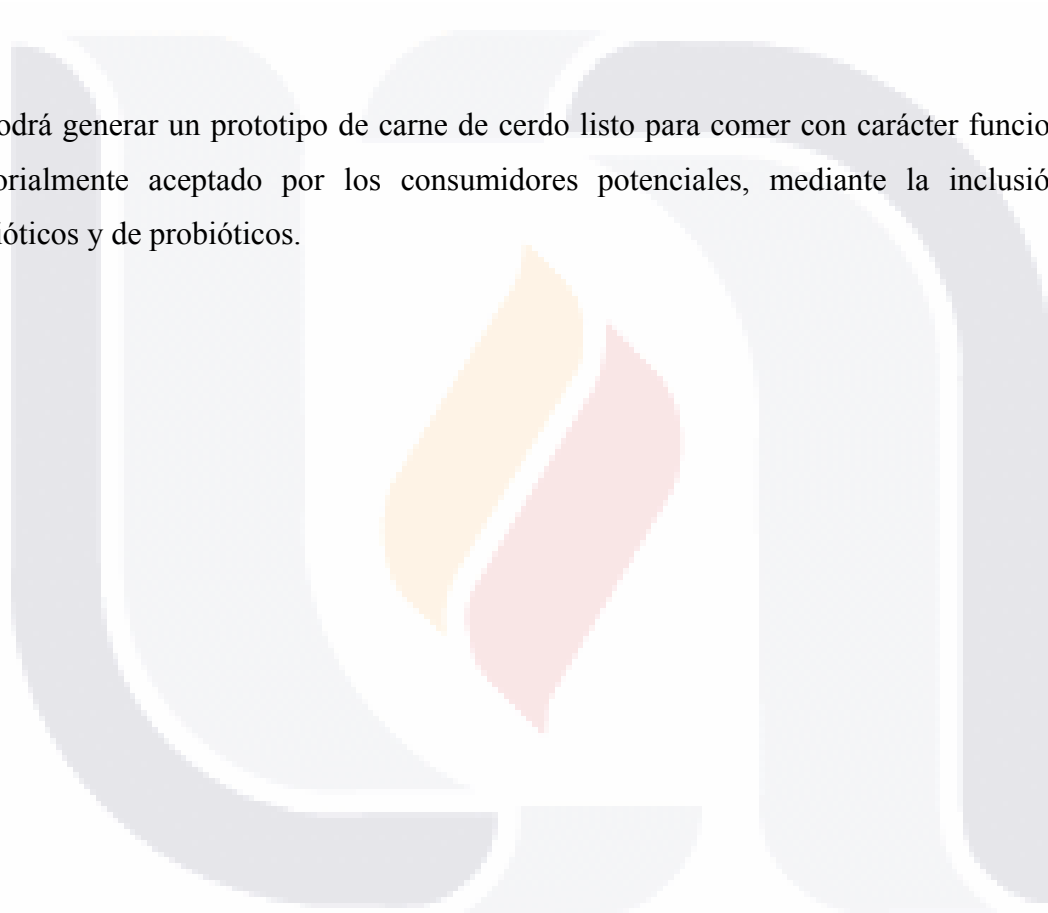
Tabla 6. Aplicaciones de bacterias ácido lácticas como cultivo bioprotector en distintos alimentos

Autor (es)	Microorganismos utilizados	Alimento	Descripción de Estudio
Rodgers <i>et al.</i> (2002).	<i>Lactococcus lactis</i> CSCC 146 y <i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 43200	Crema de mariscos, caserola vegetariana, caserola de pollo	Se aplicó la técnica de <i>sous vide</i> . El crecimiento bacteriano y la producción de bacteriocinas fueron evaluados durante el almacenamiento. Se detectó nisina y pediocina. Los atributos de color, sensación bucal, textura, sabor y aceptabilidad en general no fueron afectados por la utilización de estas bacterias y sus productos.
Jacobsen <i>et al.</i> (2003).	<i>Leuc. carnosum</i> 4010	Pescado	Se utilizaron cuatro distintos tratamientos para evaluar la influencia de <i>Leuc. carnosum</i> 4010 como cultivo bioprotector y de su bacteriocina parcialmente purificada. El método que presentó mayor biocosevación fue el añadir la cepa de <i>Leuc. carnosum</i> 4010 al producto.
Brillet <i>et al.</i> (2004).	<i>Carnobacterium</i> V41	Salmón ahumado	Tres cepas productoras de bacteriocinas fueron evaluadas contra su capacidad antilisteria. Se seleccionó a <i>Carnobacterium</i> V41 como la mejor candidata para la biopreservación de salmón ahumado refrigerado al vacío.
Castellano y Vignolo, (2006).	<i>L. curvatus</i> CRL705	Carne	Se observó un efecto bacteriostático, se comparó este efecto inhibitorio contra las bacteriocinas lactocina 705 tanto sintética como purificada, no encontrándose diferencias entre los tratamientos. Los microorganismos evaluados fueron <i>B. thermosphacta</i> y <i>L. innocua</i> . La temperatura de almacenamiento fue a 2 °C y el empaque se realizó al vacío.
Gálvez <i>et al.</i> (2008).	<i>Lactobacillus plantarum</i> y <i>L. pentosus</i>	Pescado	La inoculación de dos tipos de BAL originalmente aisladas de productos del mar en <i>D. labrax</i> refrigerado y empaque al vacío, se demostró una actividad antagonista al disminuir el pH y producir bacteriocinas, lo que sugiere la efectividad para prolongar la vida de anaquel de pescado.
Fall <i>et al.</i> (2010).	<i>Lactococcus piscium</i> CNCM I-4031	Camarón	Se observó efecto antimicrobiano contra <i>B. thermosphacta</i> en camarón y se aumentó la vida de anaquel.
Paari <i>et al.</i> (2012).	<i>Enterococcus faecium</i> FC-13	Sardinas y camarones a temperaturas de refrigeración	Se observó que al final del tiempo de almacenamiento las bacterias con el cultivo bioprotector presentaron menos cuenta bacteriana nociva. Se realizó un control con <i>Listeria monocytogenes</i> y se observó que se inhibió su crecimiento.
Di Gioia <i>et al.</i> (2016).	<i>L. plantarum</i> PCS20	Salami	Se demostró que la BAL podía ser utilizada como cultivo bioprotector en carne molida de cerdo.

3. Hipótesis

Si las bacterias ácido lácticas utilizadas en la elaboración de un producto marinado cárnico de cerdo listo para comer, tienen efecto biopreservador tanto por competencia directa contra otros microorganismos, como por la generación de sus compuestos antimicrobiano, entonces la vida de anaquel aumentará manteniendo sus características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales óptimas.

Se podrá generar un prototipo de carne de cerdo listo para comer con carácter funcional y sensorialmente aceptado por los consumidores potenciales, mediante la inclusión de prebióticos y de probióticos.



4. Objetivo General

Generar un producto cárnico biopreservado con carácter funcional, que tenga la característica de ser listo para comer.

4.1. Objetivos Particulares

1. Establecer la composición de la marinada para la carne de cerdo mediante la inclusión de tres prebióticos: inulina de achicoria, fibra de maíz y fibra de nopal.
2. Acondicionar el medio de cultivo para el crecimiento y propagación de los cultivos iniciadores (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772, *Lb. bulgaricus* 1489, *Lb. rhamnosus* GG). Evaluación del carácter prebiótico de cada uno de los ingredientes de las marinadas.
3. Determinar el efecto bactericida o bacteriostático de los cultivos iniciadores contra *Listeria innocua* y contra *Escherichia coli*.
4. Determinar el efecto de la presencia de los cultivos y metabolitos con mayor efecto bactericida y/o bacteriostático en la conservación del producto marinado durante el almacenamiento.
5. Establecer un estudio de vida de anaquel adecuado para este tipo de productos marinados.
6. Utilizar la evaluación sensorial durante cada uno de las etapas de elaboración y de vida de anaquel del producto marinado cárnico, mediante diferentes técnicas de aceptación.

5. Metodología

Para desarrollar un producto cárnico funcional biopreservado listo para comer se siguieron las etapas que se describen en la Figura 6, esta metodología consta de 5 fases. Durante la primera fase, se estableció la formulación del producto cárnico, y se realizó la evaluación desde el punto de vista sensorial y microbiológico. Ya estableciendo la composición del producto, se determinó el índice prebiótico de cada uno de los ingredientes de manera individual y en conjunto.

En la tercera fase, se evaluó el efecto inhibitorio de las bacterias ácido lácticas sobre bacterias indicadoras gram (-) y gram (+). En la cuarta fase, se inocularon estas BAL en el prototipo marinado a fin de poder evaluar la biopreservación de este y Finalmente, en la quinta fase con base en la información obtenida se calculó la vida de anaquel.

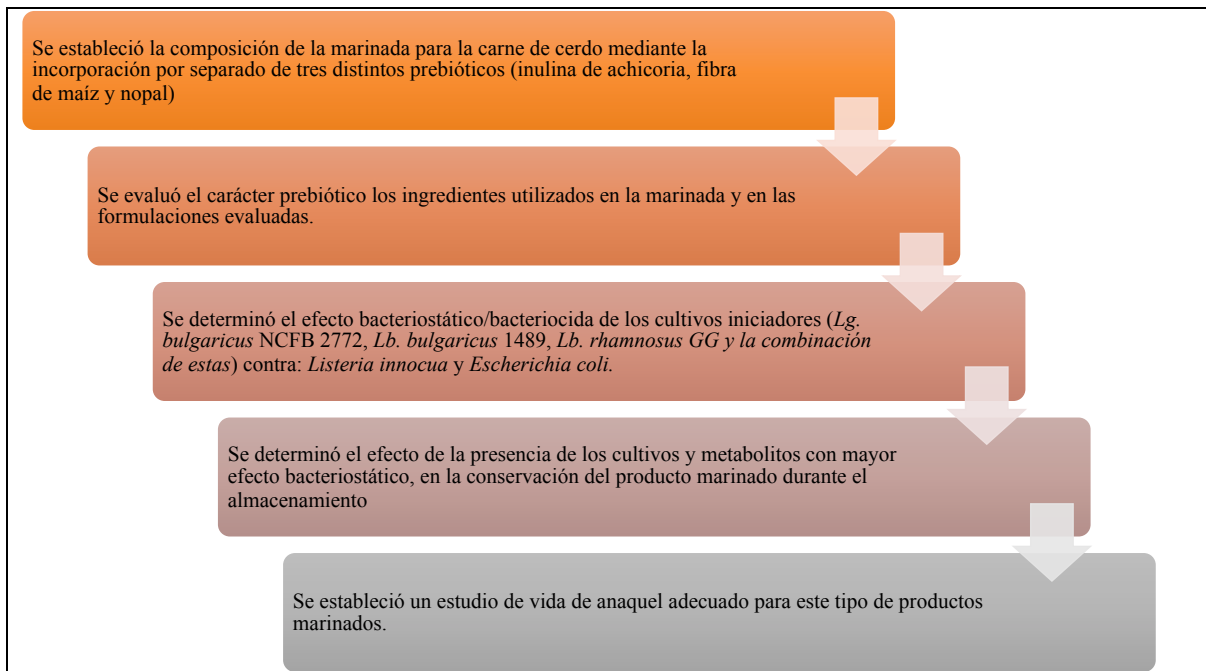


Figura 6. Diagrama de etapas de experimentación.

5.1. Desarrollo de la composición de la marinada.

El producto desarrollado fue un producto de cerdo marinado listo para comer elaborado mediante la técnica de *Sous Vide*. Esta etapa se dividió en dos, en la primera se desarrollaron cinco formulaciones cárnicas las cuales fueron analizadas desde el punto de vista de su composición química, así como de su aceptación mediante técnicas de análisis sensorial. En la segunda etapa se realizó una selección de la mejor marinada y se reformuló por medio de los resultados obtenidos en la primera fase, este prototipo se comparó con cinco marcas comerciales en el mercado.

5.1.1. Elaboración de la marinada

1. Se cubió la carne de cerdo en trozos de 3 x 3 cm.
2. Se seleccionó una marinada de distintas formulaciones (resultados no mostrados), desarrolladas en el Laboratorio Culinario de la Escuela de Dirección de Negocios Gastronómicos, de la Universidad Panamericana, Campus Aguascalientes.
3. Esta marinada fue elaborada disolviendo los ingredientes (Tabla 7) en agua caliente durante 10 min, posteriormente se licuaron durante 1 min.

Tabla 7. Formulación porcentual de los ingredientes utilizados en la marinada de las cinco formulaciones analizadas.

INGREDIENTES	PORCENTAJE (g/100g)
Agua	72.88
Vinagre blanco (La costeña, México)	7.29
Chile chipotle (Agropecuario, México)	7.29
Aceite vegetal (Mazola, México)	6.56
Jamaica (Agropecuario, México)	4.37
Ajo en polvo (Carmencita, México)	0.73
Cebolla en polvo (Escosa, México)	0.44
Romero molido (Terrana, México)	0.29
Pimienta molida (Carmencita, México)	0.15

4. Se colocaron 200 g de trozos de carne de lomo de cerdo (Empacadora de Carnes San Francisco, México), con: (1) 100 g de la marinada antes descrita, (2) 4.5 g de marinador universal 694 (Almix, México) y (3) 6 g de fibra prebiotico.
5. Se probaron tres distintas fibras prebióticas: (1) fibra de maíz (Promitor, Tate and Lyle, EUA), constituida principalmente por oligosacáridos de glucosa (Ficha Técnica, Anexo A), (2) fibra de nopal (Deshidratadora Aguascalientes, México), pero no se reporta la información sobre su estructura y su efecto e (3) inulina de achicoria (Synergy Beneo, EUA) cuya estructura es de oligofruktanos (Anexo A).
6. De tal forma que se analizaron cinco tratamientos que se elaboraron como se describe en la Tabla 8. Las muestras analizadas fueron:

- (1) AF1: la marinada de acuerdo a los ingredientes de la tabla 7,
- (2) AF2: la marinada solo con marinador universal (4.5 g)
- (3) AF3: la marinada+ marinador universal + inulina de achicoria (6g)
- (4) AF4: la marinada + marinador universal + fibra de maíz (6g)
- (5) AF5: la marinada+ marinador universal + fibra de nopal (6g)

Tabla 8. Composición de las cinco formulaciones desarrolladas.

Tratamiento	Ingredientes base (BI)		Prebióticos utilizados (PU)		
	Ingredientes Marinada (Tabla 7)	Aditivo Comercial	Inulina Achicoria (<i>Cichorium intybus</i>) (Tate and Lyle, EUA)	Fibra soluble de Maíz (Tate and Lyle, EUA)	Fibra de Nopal (<i>Opuntia ficus-indica</i>) (Deshidratadora Aguascalientes, México)
AF1	+				
AF2	+	+			
AF3	+	+	+		
AF4	+	+		+	
AF5	+	+			+

4. Se mantuvieron cada una de las mezcla antes descritas en el tambor rotatorio (Flavor Maker F-8, EUA) durante 15 min a 15 in de Hg.
5. Se empacaron los productos marinados al vacío en paquetes que contenían 30 g a una presión de 0.75 bares durante 18 s (Smartvac Mini28, Carnotex S.A. de C.V., México).
6. Se aplicó la técnica *sous vide* en un runner (SIRMAN Mod.Softcooker y09, Italia) durante 3 h a 60°C, seguido de una refrigeración en una cama de hielo por 5 mins.
7. Se refrigeraron las muestras a 3°C hasta que se utilizaron para su análisis.

5.1.3. Evaluación sensorial

Para determinar la aceptabilidad del producto se llevó a cabo un análisis sensorial donde se aplicaron 205 cuestionarios a consumidores potenciales del Estado de Aguascalientes de edades de 18 a 65 años de edad. Se buscó que los consumidores tuvieran distintos niveles socioeconómicos a fin de poder identificar los gustos en este Estado. El resumen del cuestionario aplicado se muestra en la Figura 7.

Instrucciones:
 A continuación se te presentan varias muestras. Te pido primeramente observes la muestra, luego la huelas y la pruebes.
 Posteriormente, te pido que contestes de forma inmediata y objetiva lo que se te pide. Toma agua entre cada una de ellas. Califica de acuerdo a la escala de “justamente correcto” del atributo evaluado.

ESCALA
 1= muy poco; 2= poco
3= justamente correcto (que no le hace falta ni le sobra nada)
 4= mucho ; 5= demasiado

Muestra: ----	ESCALA				
Característica	1	2	3	4	5
Sabor					
Textura suave					
Color					
Jugosidad					
Acidez					
Aceptabilidad General					

¿Cuál de éstos 5 productos prefieres? _____
 ¿Lo comprarías? **SÍ** o **NO**

Figura 7. Ficha resumida de evaluación sensorial de aceptabilidad aplicada a 205 consumidores potenciales de 18 a 65 años de edad.

La información recabada se analizó mediante las técnicas sensoriales de: Análisis de Segmentación (LSA), Justamente Correcto (JAR) y Análisis de Penalidades (PA), las cuales se describen a continuación:

1. Análisis de Segmentación (LSA). Esta prueba se basa en que los atributos son evaluados en una escala de JAR, para posteriormente adaptarla para proyectar los gustos en un mapa sensorial mediante el análisis estadístico de cada una de los atributos analizados usando el programa IFP™ (Instituto para la percepción), la información recabada permite posicionar a los prototipos evaluados. Adicionalmente, establece zonas óptimas (mayor densidad) del producto evaluando los gustos de los consumidores (Rousseau *et al.* 2012; Ennis *et al.*, 2013).
2. Justamente correcto (JAR) y análisis de penalidades. En esta prueba se pidió a los consumidores potenciales que establecieran si las muestras eran en los atributos mencionados *justamente correctos* o si poseían mas o menos intensidad del atributo evaluado. Con base en esta información se realizó un análisis estadístico con XLstat®, Addinosoft 2015 (Lawless, 2013; Popper, 2014). Para corroborar la información recabada mediante las técnicas antes mencionadas, se realizó una prueba estadística de t student ($\alpha \leq 0.05$) para comparar a dos poblaciones; se utilizó la prueba de ANOVA para establecer si existían diferencias entre tratamientos ($\alpha \leq 0.05$), en caso de haberlas se aplicó la prueba de diferenciación de Tukey, mediante el programa R. Adicionalmente, se realizó una prueba de análisis thurstoniano, mediante el programa estadístico IFP™ (Instituto para la percepción) (Ennis *et al.*, 2014).

5.1.4. Reformulación de marinada

Con base en la información recabada de los análisis sensoriales previos (LSA, JAR y CATA) se seleccionó la formulación con mejor aceptación sensorial. Sin embargo, se procedió a hacer una reformulación a fin de poder garantizar que el prototipo pudiera competir en cuanto a sabor al compararlo con otras marcas en el mercado. En la tabla 9 se muestra los cambios realizados que se basan en una disminución del vinagre, aumento

de pimentón para dar mayor color, aumento de inulina para garantizar que la marinada como tal sea un producto prebiótico y aumento de sal para dar sabor.

El procedimiento que se siguió para realizar este prototipo fue el siguiente:

1. Se cubió la carne de cerdo (lomo) en trozos de 3 x 3 cm. Se pesaron los ingredientes enlistados en la Tabla 9 y se preparó la marinada disolviendo los ingredientes en agua caliente durante 10 min. Seguido de un proceso de licuado por 1 min.

Tabla 9. Composición química de la reformulación de la marinada.

Ingredientes de Marinada	Porcentaje (%)
Agua	70.76
Jamaica (Agropecuario, México)	3.98
Aceite	5.74
Cebolla (Escosa, México)	0.39
Ajo en polvo (Carmencita, México)	0.66
Romero molido (Terrana, México)	0.26
Marinador Universal 694 (Almix)	0.60
Chipotle (Agropecuario, México)	4.42
Vinagre (La Costeña, México)	2.87
Sal	5.66
Pimentón	2.12
Inulina de achicoria enriquecida (Synergy, Beneo, EUA)	2.50
Total	100.00

2. Se preparó la formulación de acuerdo a la proporción de ingredientes de la Tabla 10 y estos se colocaron en el tambor rotatorio (Flavor Maker F-8, EUA) durante 15 min a 15 mm de Hg.

Tabla 10. Composición de ingredientes de la formulación cárnica.

Composición	Porcentaje (%)
Carne	77.5
Marinada	15.0
Inulina	2.5
Cultivo iniciador	5.0

3. La formulación se empacó al vacío en paquetes de 30 g (Smartvac Mini28, Carnotex S.A. de C.V., México) 18 s a 0.75 bares.
4. Se aplicó la técnica *Sous Vide* en un runner (SIRMAN Mod.Softcooker y09, Italia) durante 3 h a 60 °C. Se enfriaron las muestras en una cama de hielo por 5 min.
5. Las muestras se refrigeraron a 3 °C hasta que fueron utilizados para su análisis.

5.1.4.1. Análisis sensorial del prototipo con relación a marcas líderes en el mercado

Se aplicaron 72 cuestionarios sensoriales, como se muestra en la Figura 8. Se buscaron consumidores potenciales que fueran el mercado meta de nuestro prototipo, es decir, personas jóvenes principalmente estudiantes, que por su estilo de vida son candidatas a ser consumidores de este tipo de alimentos. De tal manera que las personas entrevistadas fueron jóvenes de 18-23 años. El prototipo desarrollado en el laboratorio se comparó con 5 marcas líderes comerciales en la Ciudad de Aguascalientes. Se les dio a probar la muestra correspondiente y se les pidió que contestarán el cuestionario de la Figura 8. Este fue diseñado para obtener información que pudiera procesarse mediante distintos métodos sensoriales. Se describen a continuación las cinco partes en las que se dividió el cuestionario.

Las muestras se dispusieron en platos etiquetados con las determinadas muestras. Se buscó que los productos estuvieran siempre calientes a una temperatura aproximada de 37 °C. Se les ofreció una galleta y agua a fin de que pudieran enjuagarse y probar los productos.

1. Aceptación general del producto. El consumidor debe seleccionar en una escala del 1 al 10 la aceptación general del producto, siendo 10 un producto totalmente aceptado.
2. Análisis de Segmentación (Landscape Segmentation Analysis). Esta prueba se basa en que los atributos son evaluados del 1 al 10 en cuanto a su sabor y con base en esto se detectan los gustos de cada uno de los consumidores, estos gustos

se proyectan en un mapa sensorial, como se describió en el punto 5.1.3 y utilizando el programa estadístico IFP™ (Instituto para la percepción), por lo que se posicionan cada uno de los productos con relación a los gustos de los consumidores potenciales, y se establecen segmentos densos que indican cuando convergen la distribución de cada uno de estos consumidores potenciales (Rousseau *et al.*, 2012; Ennis *et al.*, 2013).

Instrucciones: A continuación se te presentan varias muestras. Te pido primeramente observes la muestra, luego la huelas y la pruebes. Posteriormente, te pido que contestes de forma inmediata y objetiva lo que se te pide. Toma agua entre cada una de ellas.

Paso 1. Instrucciones: a continuación aparece una escala del 0 al 10 (siendo el 0 el menor valor y el 10 el mayor). Coloca una “X” en el círculo del valor elegido después de haber degustado la prueba PARA ACEPTACIÓN GENERAL DEL PRODUCTO.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Paso 2. Instrucciones: califica de acuerdo a la escala de “justamente correcto” del atributo evaluado. Donde: 1= muy poco, 2= poco, 3= **justamente correcto (que no le hace falta ni le sobra nada)**, 4= mucho y 5= demasiado.

Muestra					
Atributo	1 (-) muy poco	2 (-) poco	3 Justamente Correcto	4 (+) mucho	5 (++) demasiado
Olor					
Color					
Acidez					
Picor					
Sal					
Sabor Jamaica					
Jugosidad					
Textura					

Paso 3. Instrucciones: En la tabla superior marca del 1 al 10 como consideras a cada uno de los atributos en cuanto a su sabor.

Paso 4. Instrucciones: Selecciona los atributos de la siguiente lista que consideras que cumple el producto, tanto positivos como negativos. Escriba una “X” en el círculo en blanco al lado del atributo.

Color natural/apetecible	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>		Jugoso	<input type="radio"/>
Buena mordida	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>		Seco	<input type="radio"/>
Sabor chipotle	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>		Olor a especias	<input type="radio"/>
Insípido	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>		Pastoso	<input type="radio"/>
Ácido	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>		Color opaco u oxidado	<input type="radio"/>

Figura 8. Ficha resumida del cuestionario de evaluación sensorial aplicada a 72 consumidores, donde se comparó el prototipo reformulado con 5 marcas comerciales.

3. Justamente correcto (JAR). En esta prueba se les pidió a los consumidores potenciales que establecieran si dentro de los atributos mencionados, la muestra que se les presentaba era Justamente Correcta o si tenía más o menos del atributo en cuestión, como se describió en el punto 5.1.3. Estos resultados se analizaron por medio de los modelos thurstonianos para calcular el valor d' que simboliza que tan separadas se encuentran las crestas de las distribuciones de cada una de las curvas evaluadas, el óptimo (valor de cero) se marca de color negro y con base en esto se hace la comparación con cada una de las muestras analizadas en cada uno de los atributos evaluados. Lo que significa que un valor de d' alto es indicativo de que este atributo está lejos de lo que el consumidor considera **justamente correcto** (Ennis *et al.*, 2014). Estos análisis se llevaron a cabo mediante el programa estadístico IFP™ (Instituto para la percepción).
4. Selecciona todos los atributos que apliquen (CATA). En esta prueba se les pidió a los consumidores potenciales que palomearan si percibían los atributos que se mencionan en el cuestionario. Entre estos se encontraban, 5 atributos positivos y 5 atributos negativos. Se contabilizaron los atributos señalados y se realizó una tabla de frecuencias con base en la cual se calcularon los porcentajes de personas que habían seleccionado cada uno de los atributos evaluados (Jaeger *et al.*, 2014; Meyners *et al.*, 2013).

5.1.4.2. Evaluación de parámetros químicos mediante infrarrojo cercano.

Se utilizó un equipo de infrarrojo cercano, el cual es una técnica analítica que utiliza haces de luz en longitudes de onda que están en un rango de 800 a 2500 nm que permiten a los diferentes enlaces químicos de alimentos (C-H, N-H, O-H y S-H) absorber o emitir luz que es cuantificada y traducida en porcentaje de compuestos de importancia contenidos en alimentos (Prevolnik *et al.*, 2004).

1. Se colocaron 20 g dentro de bolsas translúcidas en un infrarrojo cercano FT-NIR (Buchi, Suiza).

2. Se realizó la lectura a distintas longitudes de onda y se obtuvo el porcentaje de humedad, grasa, proteína, tejido conectivo, BEEFE y cenizas. Con base en esta información se realizó un análisis estadístico ANOVA con XLstat®, Addinsoft 2015 para establecer si existían diferencias significativas entre tratamientos ($\alpha \leq 0.05$), y en caso de haberlas se utilizó una prueba de diferencia de Tukey.

5.2. Evaluación de capacidad prebiótica de las bacterias ácido lácticas.

La evaluación de la capacidad prebiótica *in vitro* de las bacterias ácido lácticas se realiza en un medio simple con una fuente de carbono determinada a fin de probar que esta pueda ser utilizada para el crecimiento de las mismas.

Las fuentes de carbono utilizadas en esta parte de la experimentación se dividen en dos, por un lado se probaron cada uno de los ingredientes utilizados para desarrollar las marinadas, a fin de evaluar si estas presentaban un efecto prebiótico. Por otro lado, se probaron las tres formulaciones de las marinadas, en cada una de ellas, además de los ingredientes analizados, se utilizaron tres distintos prebióticos: inulina de achicoria, fibra de maíz y fibra de nopal.

Las BAL probióticas que se probaron en este estudio se detallan a continuación.

5.2.1. Bacterias ácido lácticas

Para este estudio se utilizaron tres BAL, cada una con características únicas.

1. *Lb. rhamnosus* GG (*Lb.* GG), aislado de un producto comercial por investigadores la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), Iztapalapa, México. Esta bacteria tiene la característica de ser **probiótica**.
2. *Lb. delbrueckii* subsp. NCFB 2772 (*Lb.* 2772), del National Collection of Food Bacteria (Reading, Inglaterra), que tiene la característica de ser productora de exopolisacárido (**bacteria filante**).
3. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 1489 (*Lb.* 1489), del National Collection of Food Bacteria (Reading, Inglaterra).

5.2.2. Fermentación

La fermentación se llevó a cabo en dos fases, preparación del pre-inóculo y medio de cultivo simple donde utilizaron varias fuentes de carbono seleccionadas. Posteriormente, se llevaron a cabo las distintas fermentaciones durante un período de 12 h. A continuación se describen cada una de estas fases de esta parte de experimentación.

5.2.2.1. Preparación del pre-inóculo de las bacterias ácido lácticas (BAL)

1. Se prepararon 3 matraces erlenmeyer con 50 mL de caldo MRS (Medio Man Rogosa Sharpe; BD, Becton Dickinson and Company, EUA), que es un medio selectivo para BAL.
2. Se esterilizaron a 121 °C durante 15 min.
3. Se inoculó este medio de cultivo con *Lb. delbrueckii* subsp. NCFB 2772 (*Lb.* 2772), *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 1489 (*Lb.* 1489) y *Lb. rhamnosus* GG (*Lb.* GG) al (4% v/v) , cada una de estas se desarrolló por separado.
4. Se incubó a 37°C durante 24 h.

5.2.2.2. Preparación del medio de cultivo para las bacterias ácido lácticas

1. En la primera parte de este experimento se preparó un medio simple con base en las indicaciones de la tabla 11.

Tabla 11. Composición química del medio simple utilizado para medir la capacidad prebiótica.

Ingrediente	Fracción (g/100 mL)
Fuente de carbono (aditivos comerciales)	1
Extracto de levadura	0.3
Peptona de caseína	0.5

*Se esterilizó el medio a 121 °C durante 15 min.

2. Se utilizaron como fuentes de carbono cada uno de los ingredientes incorporadas en la marinada (Tabla 12).

Tabla 12. Fuentes de carbono utilizadas para determinar índice prebiótico.

Fuente de carbono evaluada (1%)
Fibra de nopal
Fibra de maíz
Inulina
Marinador
Chipotle
Jamaica
Ajo en polvo
Cebolla en polvo
Romero molido

3. En la segunda parte del experimento se prepararon las marinadas de acuerdo a la composición porcentual reportada en la Tabla 9 y 10. De tal forma que se obtuvieron tres formulaciones de marinada que contenían tres distintos prebióticos: (1) inulina de achicoria, (2) inulina de maíz y (3) fibra de nopal.
4. Se esterilizaron 25 mL del medio de cultivo en botellas serológicas de 50 mL.
5. Se agregó la cantidad de inóculo adecuada mediante un ajuste del volumen de acuerdo al valor de 0.5 de la escala de McFarland que corresponde en 0.08-0.1 de absorbancia medida a una longitud de onda de 625 nm.
6. Se incubó a 37°C con agitación suave a 50 rpm.

5.2.3. Determinación de índice prebiótico (IP)

1. De los medios simples descritos anteriormente, se tomaron muestras de 1 mL cada 2 h durante 12 h en condiciones estériles con la ayuda de una jeringa para preservar la atmósfera limitada en oxígeno. Esto con la finalidad de evaluar la densidad óptica (D.O.) de los microorganismos que se desarrollan en estos medios.
2. Se leyó la absorbancia a 650 nm con celdas de vidrio.

3. Se utilizó la ecuación 1, basada en estudios de Palfram *et al.* (2003), para determinar el índice prebiótico de cada uno de los ingredientes y de las tres formulaciones de las marinadas desarrolladas.
4. Se reportaron los datos en tabla.

Ecuación 1. Determinación del índice prebiótico.

$$\text{Índice prebiótico} = \frac{\text{D.O.}_{\text{mezcla final}} - \text{D.O.}_{\text{mezcla inicial}}}{\text{D.O.}_{\text{medio final}} - \text{D.O.}_{\text{medio inicial}}}$$

Donde:

- D.O. _{mezcla final} = densidad óptica del medio simple con las distintas fuentes de carbono a las 12 h a $\lambda_{650 \text{ nm}}$
- D.O. _{mezcla inicial} = densidad óptica del medio simple con las distintas fuentes de carbono al inicio de la fermentación 0 h a $\lambda_{650 \text{ nm}}$
- D.O. _{medio final} = densidad óptica del medio simple fermentado con lactosa a las 12 h a $\lambda_{650 \text{ nm}}$
- D.O. _{mezcla inicial} = densidad óptica del medio simple fermentado con lactosa al inicio de la fermentación 0 h a $\lambda_{650 \text{ nm}}$

5.3. Determinación de compuestos antimicrobianos producido por bacterias ácido lácticas.

Las bacterias ácido lácticas tienen la capacidad de producir compuestos antimicrobianos, como el ácido láctico, el peróxido de hidrógeno y las bacteriocinas. En la metodología que se menciona a continuación se realizaron distintos tratamientos con la finalidad de eliminar de manera secuencial los distintos compuestos inhibidores presentes. Por otro lado, los microorganismos utilizados son cultivos indicadores (*Escherichia coli* y *Listeria innocua*), los cuales pueden simular la presencia de los microorganismos gram (-) y gram (+) que son los más comunes en enfermedades transmitidas por productos cárnicos. Estos últimos se incubaron en cada una de las fracciones a fin de poder calcular el porcentaje de inhibición de los compuestos sobre estas bacterias indicadoras.

5.3.1. Preparación del pre-inóculo de bacterias indicadoras *E. coli* y *L. innocua*.

Se prepararon dos pre-inóculos de *E. coli* como indicador de contaminación fecal (gram negativo) y *L. innocua* como bacteria gram positivas.

5.3.1.1. Pre-inóculo de *E. coli*

1. Se prepararon 2 tubos de ensaye con 10 mL de caldo nutritivo.
2. Se esterilizaron los medios a 121°C durante 15 min.
3. Posteriormente se inoculó el medio de cultivo con *E. coli* (100 µL).
4. Se incubó a 37°C durante 24 h.

5.3.1.2. Pre-inoculo de *L. innocua*

1. Se prepararon 2 tubos de ensaye con 10 L de caldo infusión cerebro corazón.
2. Se esterilizaron a 121°C durante 15 min.
3. Se inoculó este medio con *L. innocua* (100 µL).
4. Se incubó a 37°C durante 24 h.

5.3.2. Fermentación de las BAL

1. Se inocularon 50 mL de caldo MRS (Medio Man Rogosa Sharpe, Becton Dickinson and Company, EUA), que es un medio selectivo, previamente esterilizado a 121°C durante 15 min.
2. Se inoculó por separado cada uno de los siguientes microorganismos de forma directa de (500 mg/L), preparadas previamente como se indica en el apartado 5.2.1., desarrollándose cinco tratamientos: *Lb. 2772*, *Lb. 1489*, *Lb. GG*, *Lb 2772 + Lb.GG* y *Lb. 1489 + Lb. GG*.
3. Se incubó a 37°C durante 24 h.

4. Se centrifugaron los medios de cultivo ya fermentados a 5,000 rpm (Centrifuga Beckman modelo J2-MI) durante 30 min a 4°C.
5. Se tomaron muestras de los sobrenadantes y se guardó en refrigeración para su posterior análisis.

5.3.3. Obtención de sobrenadantes con acción antimicrobiana

A) Neutralización de ácidos orgánicos.

1. Se neutralizaron los sobrenadantes obtenidos de las fermentaciones a pH=7 en condiciones estériles utilizando NaOH 1 M (Sigma, México), para eliminar el efecto inhibitorio atribuido a los ácidos orgánicos (Sezer y Guven, 2009).
2. Se tomaron muestras de los sobrenadantes neutralizados, se guardaron en refrigeración para su posterior análisis.

B) Eliminación de peróxido de hidrógeno.

1. Se adicionó 1 mL de la enzima catalasa a los sobrenadantes neutralizados para eliminar el efecto del peróxido de hidrógeno (Sezer y Guven, 2009), a una concentración de 0.1 mg/mL (SIGMA, 3809 units/mg Solid). Se preparó la catalasa en buffer de fosfato 0.1 M pH= 7.0 y se filtró mediante un filtro de 0.22 µm.
2. Se incubaron los sobrenadantes a 25°C durante 90 min. Se inactivó la enzima a 60°C durante 10 min.
3. Se centrifugaron las muestras a 5,000 rpm por 30 min a 4°C (Beckman modelo J2-MI).
4. Se tomaron las muestras de los sobrenadantes y se guardaron en refrigeración para su posterior análisis.

C) Eliminación de proteínas y péptidos

1. Se utilizó la enzima proteinasa K para la hidrólisis de la bacteriocina presente (Mobarez *et al.*, 2008) a una concentración de 0.1 mg/mL (SIGMA-ALDRICH 6.1 units/mg Solid). Se preparó la enzima proteinasa K en buffer de fosfato 0.1 M pH=7 y se filtró con un filtro de 0.22 μ m.
2. Los sobrenadantes se incubaron a 37 °C durante 120 min.
3. Se inactivó la enzima a 60 °C durante 10 min.
4. Se centrifugó el sobrenadante a 5,000 rpm por 30 min a 4°C.
5. Se guardaron las muestras en refrigeración para su análisis.

5.3.4. Determinación de inhibición por los compuestos antimicrobianos producidos durante la fermentación sobre microorganismos indicadores.

1. De los medios de cultivo fermentados de *E. coli* y *L. innocua* (24 h), se transfirieron 12.5 mL a un matraz que contenía 50 mL de medio fresco para cada microorganismo.
2. Se incubó por 3 h a 37°C con una agitación de 150 rpm para obtener células en fase de crecimiento logarítmica.
3. A las 3 h de fermentación se realizó una dilución de manera que el cultivo a utilizar para el análisis tuviera una absorbancia final de 0.120 UA.
4. Se determinaron cada uno de los compuestos antimicrobianos: ácido láctico, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas; mediante tubos de ensaye que contenían 0.5 mL de los sobrenadantes o bien el medio de cultivo control (caldo MRS), más 2 mL de medio de cultivo con el microorganismo indicador.
5. Se incubó durante 3 h a 37°C.
6. Se determinó el crecimiento microbiano por turbidimetría a 650 nm en celdas de vidrio (Papagianni *et al.*, 2006).

7. El porcentaje de células inhibidas se determinó por triplicado mediante la ecuación 2 y los resultados fueron analizados mediante la prueba de ANOVA; en caso de existir diferencia estadística ($\alpha \leq 0.05$), se utilizó una prueba de diferencia de Tukey mediante el programa XLstat ®, Addinosoft 2015.

Ecuación 2. Cálculo del porcentaje de inhibición debida a compuestos antimicrobianos.

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \frac{(\text{D.O p} \times 100)}{\text{D.O c}}$$

Donde:

D.O p = Densidad óptica de prueba (3h).

D.O c = Densidad óptica del control.

5.4. Determinación de bioconservación del producto marinado durante el almacenamiento.

En esta fase de la experimentación se buscó evaluar el efecto de bioconservación en las marinadas, para lo cual se inocularon las bacterias ácido lácticas en el prototipo y se comparó contra un control. Se realizaron evaluaciones microbiológicas, fisicoquímicas y sensoriales para evaluar el efecto de la inclusión de las BAL de estudio sobre estas variables.

5.4.1. Propagación de microorganismos

1. Se utilizaron las BAL descritas en el apartado 5.2.1., evaluando tres tratamientos: (1) *Lb. GG*, (2) *Lb. 2772* y (3) la combinación de ambas.
2. Se adicionó el contenido del tubo inicial de las distintas BAL en un matraz Erlenmeyer con 20 mL de caldo MRS (BD Becton, Dickinson and Company, EUA), que es un medio selectivo para BAL, previamente esterilizado por 15 min a 15 psi. Estos se sembraron solos y también se evaluó el efecto combinado de la bacteria probiótica (*Lb. GG*) con las otras bacterias de estudio *Lb. 2772* y *Lb GG*.

3. Se incubó cada uno de estos microorganismos y la combinación de bacterias durante 24 h a 37°C
4. Una vez crecido el microorganismo, se tomó 0.5 mL del caldo fermentado y se mezcló con 0.5 mL de glicerol estéril en tubos eppendorf de 1.5- 2.0 mL de capacidad.
5. Los microorganismos preparados de esta manera se conservaron en congelación a -20°C para su posterior utilización.
6. Para cada experimento, se tomó uno de estos tubos y se inoculó en 95 mL de leche, la fermentación se llevó a cabo durante 12 h, hasta que se alcanzó un pH menor a 5.
7. Se inoculó cada una de las BAL al 5% en el prototipo listo para comer que se elaboró de acuerdo al apartado 5.1.4.

5.4.2. Evaluación Físicoquímica

Se evaluaron los parámetros que tienen más incidencia en la compra del producto como son: color, pH, oxidación de proteínas, oxidación de lípidos y textura. Las muestras se mantuvieron a 6°C durante 21 d.

5.4.2.1. Evaluación de Color

El color es uno de los parámetros más importantes para la evaluación de calidad en carne. En productos cárnicos se busca que los cambios de color sean los mínimos a fin de poder garantizar su calidad.

Para evaluar este parámetro, se tomaron 3 mediciones del color de la superficie de los productos con una pistola de medición de color PANTONE (CAPSURE) enfocándose únicamente en los resultados de los valores CIE L*a*b*: L (lightness/luminosidad), a (redness) y b (yellowness).

La escala de color CIE L*a*b* se basa en la teoría de colores opuestos, la cual establece que el ojo humano percibe los colores como pares de opuestos (Fig. 9): L

representa la luminosidad (pálido vs colorado) de un producto y los valores a^* y b^* son coordenadas representadas en un diagrama de cromatografía que indican el color correspondiente. Se determinó una diferencia del color (ΔE) de las muestras durante el tiempo de almacenamiento utilizando la ecuación 3.

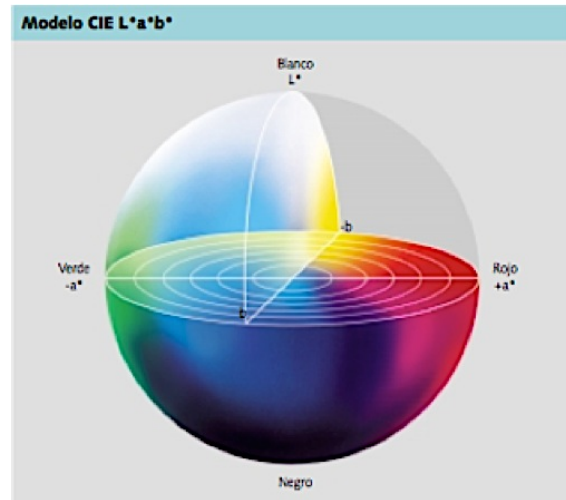


Figura 9. Cromatograma de color (Basangov, 2013).
 Donde L: oscuro (0-50) vs claro (51-100)
 a: rojo (+) vs verde (-),
 b: amarillo (+) vs azul (-).

Ecuación 3. Ecuación para determinar cambio de color utilizando el sistema $L^*a^*b^*$.

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

Donde:

ΔE = Cambio de color

L= representa la luminosidad de un producto. Se compara el producto de interés vs el control para encontrar el cambio en este parámetro (ΔL).

a= indica que tan rojo o verde es el producto, se compara el producto con respecto al control (Δa)

b= indica que tan amarillo o azul es el producto, se compara el producto con respecto al control (Δb)

5.4.3. Oxidación lipídica y proteica.

Durante el almacenamiento ocurre una oxidación de la carne, donde se oxidan tanto las proteínas como lípidos, lo que se ve traducido en cambios en color y textura de los productos.

Para cuantificar la oxidación de lípidos se utilizan varios métodos, el más comúnmente reportado es el método del ácido tiobarbitúrico (TBARS) que mide la reacción del TBARS con grupos aldehído que se originan de la oxidación de ácidos grasos insaturados formando un compuesto cromóforo rojo que es medido a 532-537 nm, utilizando malonaldehído (MDA) como estándar (Venegas y Pérez, 2009).

Uno de los métodos para la cuantificación de la oxidación de proteínas se conoce como la técnica de fluorescencia, donde el compuesto formado es el resultado entre los productos de oxidación de lípidos (aldehídos) y proteínas (aminos), que posee propiedades espectrales que pueden ser detectadas a 450 nm. Otro método, se basa en cuantificar las hidrazonas que se forman al reaccionar los grupos carbonilos (productos de oxidación de proteínas) con el DNPH (Dinitrofenilhidrazina), estos compuestos son medidos a 370 nm (Armenteros *et al.*, 2009).

5.4.3.1. Oxidación lipídica (Método de TBARS)

1. Se pesaron 5 g de carne y se homogenizaron con 20 mL de una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 5% p/V durante 1 min.
2. El homogenizado se centrifugó a 1000 rpm durante 20 min a 4°C.
3. Posteriormente el sobrenadante se filtró a través de papel whatman del número 4, del extracto obtenido se tomó 1 mL y se le adicionó 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 80 mM.
4. Se aplicó un tratamiento térmico a 94°C durante 30 min.
5. Se dejó enfriar.
6. Se determinó la absorbancia a 530 nm en un lector de placas.
7. Los resultados se reportaron en mg de malonaldehído (MDA)/Kg de carne utilizando el coeficiente de extinción molar 1.56×10^5 L/mol*cm.

5.4.3.2. Oxidación proteica:

5.4.3.2.1. Método de Fluorescencia

1. Se utilizaron 2 g de carne y se homogenizaron durante 1 min con 10 mL de buffer de fosfatos con 0.6 N NaCl y pH 6.
2. Este extracto se filtró y se colocó en una placa para medir en un lector de placas las unidades de fluorescencia, a una intensidad de 450 nm de emisión y 350 nm de excitación, se reportó la intensidad de fluorescencia por mg de proteína.

5.4.3.2.2. Método del DNPH

1. Se pesaron 3 g de carne y se homogenizaron con 30 mL de buffer de pirofosfato a pH 7.4 durante 30 s.
2. Del homogenizado se tomaron dos alícuotas de 0.1 mL.
3. Posteriormente se les adicionó 1 mL de TCA al 10 % p/V.
4. Se centrifugaron durante 5 min a 5000 rpm.
5. Se eliminó el sobrenadante, se tomaron 2 pellets del precipitado al primero se le adicionó 1 mL de DNPH al 2% p/v en HCl 2 N y al segundo 1 mL de HCl 2 N.
6. Los tubos se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente agitando cada 15 min.
7. Una vez transcurrido ese tiempo se adicionó a cada tubo 1 mL de TCA al 10%, se centrifugaron a 500 rpm durante 5 min y se lavó el precipitado con 1 mL de etanol/acetato de etilo (1:1).
8. Se agitó y se resuspendió el precipitado en 1.5 mL de buffer de fosfatos 20 nM a pH 6.5 con hidrocloreuro de guanidina 6M.
9. Se calculó la concentración de proteína a 280 nm y el contenido de carbonilos a 370 nm utilizando el coeficiente de extinción molar de hidrazonas 21 L/mmol*cm. Los resultados se expresaron en nM de hidrozonas/mg de proteína.

La oxidación lipídica y de proteínas se analizó mediante una prueba estadística de Análisis de Componentes Principales, n respecto al tiempo.

5.4.4. Análisis de Perfil de Textura (TPA)

Las pruebas de textura (TPA) simulan la sensación que puede tener un consumidor al realizar dos mordidas en el alimento (Domínguez *et al.*, 2001). Se pueden obtener varios parámetros de medición: fracturabilidad, dureza, cohesividad, elasticidad y adhesividad, como se muestra en la Figura 10.

1. Las pruebas se llevaron a cabo en un analizador de textura TA.XT2 Texture Analyser (Stable Micro Systems Ltd. Haslemere, Reino Unido).
2. Se realizó una prueba de perfil de textura, en una muestra de carne de 3 x 3 cm, utilizando como geometría de plato para compresión de 75 mm, la fuerza del trigger que se utilizó 0.49 N, una velocidad de prueba de 5 mm/s y el tiempo de 5s. Las pruebas se realizaron por triplicado.

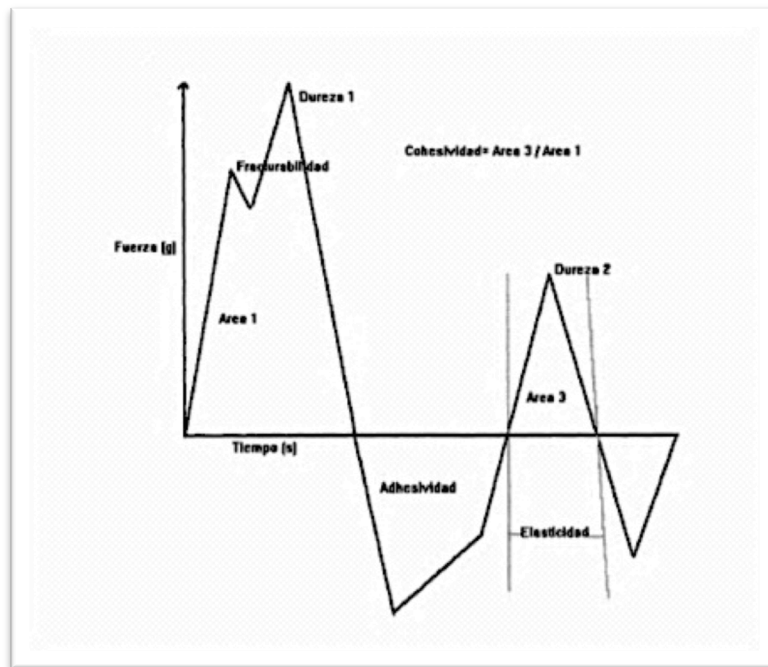


Figura 10. Análisis de Perfil de Textura (TPA) de las pruebas cárnicas marinadas bioconservadas. Durante esta prueba se hacen dos penetraciones, simulando dos mordidas, siendo las variables respuesta: fracturabilidad, dureza, adhesividad, elasticidad y cohesividad (Domínguez *et al.*, 2001).

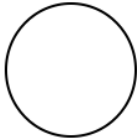
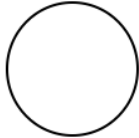
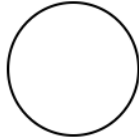
5.4.5. Evaluación sensorial

La evaluación sensorial tiene varias vertientes en este caso se utilizaron pruebas de diferencia para poder detectar las mismas entre tratamientos con respecto a los atributos de color y olor, evaluados con respecto al tiempo a diferentes temperaturas de almacenamiento. Además, se realizaron pruebas para identificar atributos que se pueden ir desarrollando durante el tiempo del almacenamiento.

Para ello se llevó a cabo la siguiente metodología:

1. Se realizó un entrenamiento de un panel, el cual duró varias sesiones para identificar los atributos que tienen más peso para determinar sensorialmente a los prototipos y poder evaluar cuales son las variaciones que se presentan con relación a nuestro producto. Con base en esto, se diseñó una terminología que fuera la utilizada por los panelistas. Se aplicó un cuestionario con dos pruebas, el cual se muestra en la Fig. 11 y en cada sesión se solicitó el apoyo de 8 jueces para evaluar las muestras.

PRUEBA TRIANGULAR DE COLOR/OLOR
PRODUCTO: CARNE DE CERDO MARINADA
Instrucciones: Lea cuidadosamente lo que se pide y conteste de acuerdo a su criterio.
Nota: Puede reevaluar las muestras las veces que sea necesario.
Paso 1. Enfrente de usted hay tres muestras, dos son iguales y una diferente. Evalúe el **COLOR/OLOR** de los productos comenzando por la izquierda y ponga una X sobre el código que es diferente a los otros. Sólo debe elegir una muestra.

104  223  241 

Paso 2. Selecciona los atributos que caractericen a la muestra seleccionada.

Color natural	<input type="radio"/>	Color brillante	<input type="radio"/>
Color oxidado	<input type="radio"/>	Color opaco	<input type="radio"/>
Color apetecible	<input type="radio"/>	Color desagradable	<input type="radio"/>

Figura 11. Cuestionario resumido de evaluación sensorial mediante una prueba triangular aplicada al panel entrenado.

Las pruebas sensoriales de diferenciación aplicadas fueron:

- a. Prueba triangular: donde se le pedía a los panelistas que evaluaran si detectaban las diferencias en el olor y color usando una prueba triangular que fue analizada mediante pruebas estadísticas de X^2 ($\alpha \leq 0.05$).
- b. Prueba CATA, donde se les pidió a los panelistas que identificaran la presencia de 10 atributos, 5 de los cuales eran negativos y los otros positivos. Este cuestionario resumido se muestra en la Fig. 11.

5.4.6. Cuantificación de microorganismos

Para analizar la cantidad de microorganismos presentes se utilizaron los siguientes medios:

1. Agar Eosina Azul de Metileno (EMB, BD, Becton Dickinson and Company, EUA), es un medio selectivo y diferencial que permite el crecimiento de microorganismos aeróbicos, que pueden ser fermentadores o no de lactosa.
2. Agar Mann Rogosa Sharpe (MRS, BD, Becton Dickinson and Company, EUA), es un medio selectivo utilizado para la cuenta total de BAL.

5.5. Vida de anaquel del prototipo.

Para evaluar las condiciones de vida de anaquel, deben seleccionarse las temperaturas de: exhibición del producto, transporte, almacenaje, etc. Se han desarrollado tres tipos de pruebas: (a) pruebas estáticas, desarrolladas a una temperatura determinada, (b) pruebas de vida acelerada, en las cuales se realiza una cinética del deterioro del producto y donde se utiliza la ecuación de Arrhenius y (c) pruebas de abuso de temperaturas del producto (Fuller, 2011). La determinación de la vida y estabilidad del producto es muy importante pues señala el período en que el alimento se mantiene en buen estado. Las temperaturas de almacenamiento estudiadas fueron de 6°C, 26°C y 36°C.

5.5.1. Determinación matemática de vida de anaquel

Como se mencionó previamente, uno de los métodos que se han utilizado más comunmente para calcular la vida de anaquel, se basa en el Modelo de Arrhenius, que matemáticamente explica la pérdida de calidad en los alimentos (Chica Cardona y Osorio Saldarriaga, 2003). En el caso de la carne, el color tiene un peso especial cuando se comercializa, aún en cerdo. Por tal motivo, tomando en cuenta este parámetro, se siguió la metodología matemática que se describe a continuación.

1. Se estableció el orden de reacción que correspondía para cada una de los parámetros analizados; cero o uno. Para ello, se realizaron dos gráficas, una para evaluar si es de orden cero, donde se graficó tiempo (t) vs el parámetro de evaluación. En caso de ser de orden uno se grafica t vs el ln del parámetro de evaluación. Se compararon los dos factores de correlación (R^2), el de mayor valor, es el que da mayor explicabilidad a los datos y por tanto es el apropiado (Ecuación 4).

Ecuación 4. Ecuación para encontrar la constante de reacción (k_0).

Tipo de orden de reacción	Ecuación de la recta $y=m x +b$
Orden cero	$C= -kt + C_0$
Primer orden	$\ln C= -kt +\ln C_0$

Donde:

C= Concentración (mol/L)
K= Constante de reacción de la ecuación de Arrhenius (mol/Ls)
T= temperatura (°C)
Co= Concentración inicial (mol/L)

2. Se obtuvo la velocidad de reacción de Arrhenius (k_0) despejando este parámetro a partir de la Ecuación 4.
3. Se calculó la energía de activación (E_a) siguiendo los cálculos mencionados en la Ecuación 5.

Ecuación 5. Ecuación de Arrhenius para encontrar energía de activación (Ea).

Ecuación de Arrhenius

$$K = k_0 e^{-E_a/RT}$$

$$\ln K = \ln k_0 - E_a/R (1/T)$$

Donde:

La pendiente es $m = E_a/R$

E_a = Energía de activación

R = cte de los gases = 1.9869 cal/mol K = 8.31432 J/ mol K

Despejando:

$E_a = (m) \text{ cte de los gases}$

4. Se calculó Q_{10} , que se refiere al incremento de velocidad de reacción, en este caso, reacción de deterioro, cuando la temperatura aumenta en 10°C , temperaturas evaluadas fueron: 6°C , 26°C y 36°C .

Ecuación 6. Ecuación para calcular la relación entre la vida de anaquel con 10°C de diferencia (Q_{10}).

$$Q_{10} = k_{35}/k_{25} = \Theta_{35} / \Theta_{25}$$

Donde:

Q_{10} = El parámetro Q_{10} se define como la razón entre la vida de anaquel a una temperatura (T) y la vida de anaquel a otra temperatura con 10° de diferencia (T+10).

K_{35} = Constante de reacción a 35°C (mol/Ls)

Θ_{35} = representación de constante de reacción en términos de vida de anaquel.

K_{25} = Constante de reacción a 25°C (mol/Ls)

Θ_{25} = representación de constante de reacción en términos de vida de anaquel.

5. Con base en esta información se calculó la vida de anaquel, de acuerdo a la ecuación 7.

Ecuación 7. Ecuación para calcular la vida de anaquel

$$\ln C_e = -k \Theta + \ln C_o$$

Donde:

C_e = Color final de la vida de anaquel.

K = Constante de reacción (mol/Ls)

C_o = Concentración inicial (mol/L)

Θ = vida de anaquel

$$\ln C_e = -k \Theta + \ln C_o$$

Donde:

C_e = Color final de la vida de anaquel.

K = Constante de reacción (mol/Ls)

C_o = Concentración inicial (mol/L)

Θ = vida de anaquel

6. Resultados y Discusión

6.1. Desarrollo y selección de la composición de la marinada

Se desarrollaron cinco formulaciones de cárnicos marinados utilizando los ingredientes de la Tabla 7 y 8, siguiendo la metodología establecida, estas fueron analizadas primeramente mediante un análisis sensorial, seguido de un análisis bromatológico.

6.1.1.2. Análisis Sensorial de las formulaciones

Se realizó un análisis sensorial a 205 consumidores potenciales a fin de elegir la mejor formulación. Los datos obtenidos fueron analizados mediante distintas técnicas sensoriales: Análisis de Segmentación, Técnica de Justamente Correcto y Análisis de Penalidades, como se muestra en las Figuras 12 a 22.

6.1.1.2.1. Análisis de Segmentación

El análisis de segmentación agrupó los gustos de los consumidores potenciales en zonas o clústers, los cuales se representan con manchas anaranjadas (Fig 12).

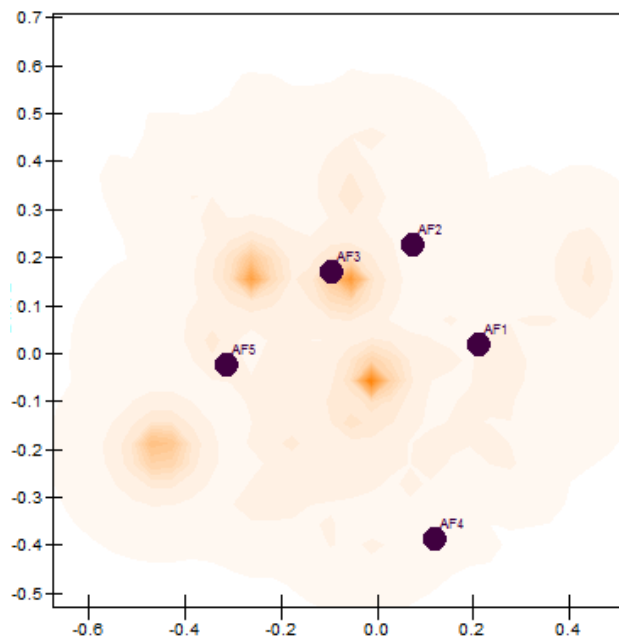


Figura 12. Análisis de segmentación de las cinco distintas formulaciones evaluadas. Donde: AF1: sabor de la marinada, AF2: marinador universal, AF3: AF1+AF2+inulina de achicoria, AF4: AF1 + AF2 + fibra de maíz y AF5: AF1 + AF2 + fibra de nopal; n= 205.

Se observó que existen tres zonas predominantes de gusto entre los consumidores potenciales de Aguascalientes (Fig. 12). La formulación que se encontró cercana a estas tres zonas es el prototipo AF3, el cual corresponde al elaborado con inulina de achicoria. Esto significa que si éste producto se llevara a nivel comercial podría satisfacer la demanda de los consumidores del Estado de Aguascalientes. El estudio de segmentación se ha utilizado previamente para establecer los distintos grupos de población en Colorado (EUA) relacionado a la preferencia de consumo de carne por parte de los consumidores (Dawn *et al.*, 2006).

Los consumidores se agruparon de acuerdo a su edad en distintas categorías (Figura 13), los resultados demostraron que existe un efecto de la edad sobre el gusto de los prototipos, se observó que la explicabilidad del modelo con respecto a los sujetos es de R^2 : 0.71 y del producto R^2 : 0.99.

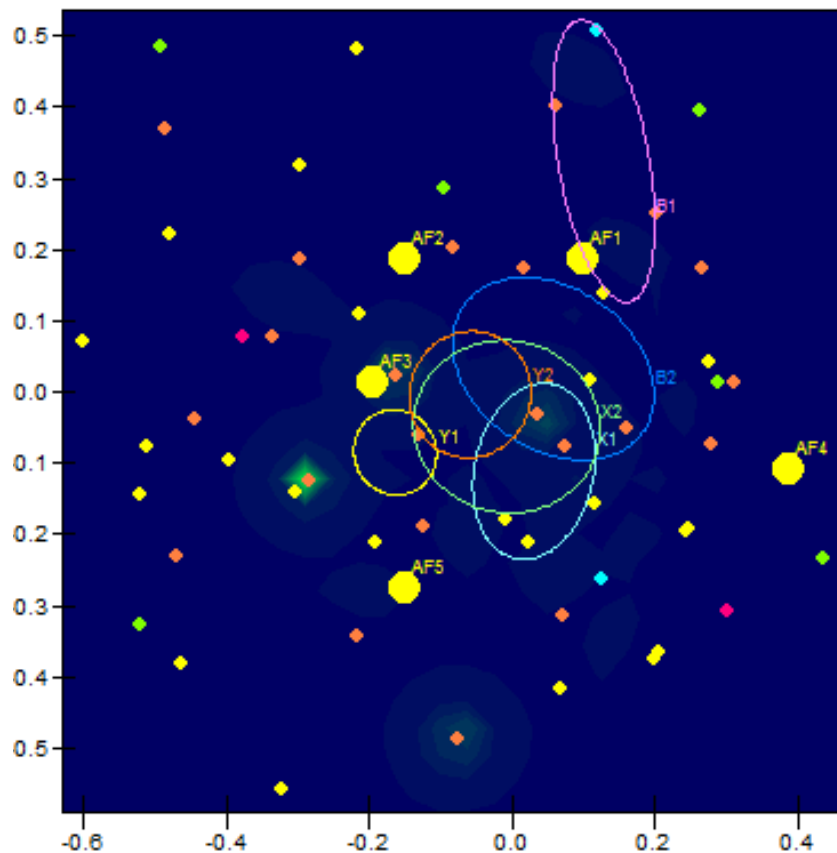


Figura 13. Efecto de edad (años) sobre la preferencia de las formulaciones mediante la técnica de segmentación.

Donde: Y1= 18-26; Y2=27-34; X1=35-42; X2=43-50; B1=51-58; B2=59-66; n=205.

El modelo indicó que las personas entre 18 y 50 años se encontraron posicionadas muy cerca del prototipo AF3 (correspondiente al elaborado con inulina), reflejando que esta formulación es la preferida. Las personas cuyo rango de edad se encontró entre los 51 y 58 años, prefirieron la muestra AF1 que fue el tratamiento de la marinada natural, esto pudo deberse a sus hábitos en su consumo, donde buscaban algo más casero y no visualizaron que las formulaciones eran productos listos para comer, esta formulación no contenía el marinador universal que utiliza aditivos como el glutamato monosódico. Las personas entre 59 a 66 años, no tuvieron una definición entre los prototipos preferidos, esto pudo deberse a que ya son mayores y que su sentido del gusto pudo verse afectado por cuestiones de edad o de cambios de hábitos alimenticios por enfermedades, entre otras causas.

En el Anexo B se encuentran los resultados de las pruebas estadísticas de X^2 que fueron aplicadas para evaluar las diferencias observadas de acuerdo a cada uno de los grupos establecidos según su edad. Haciendo comparación por pares de cada uno de estos, las personas entre 51 y 58 años tienen preferencias completamente distintas a los demás grupos analizados ($\alpha \leq 0.05$), lo que puede deberse a que este grupo tenga un paladar más selectivo en cuanto a gustos.

En la Figura 14 se estableció que no existe una diferencia significativa ($\alpha > 0.06$) entre la forma en que perciben las formulaciones las mujeres y los hombres. Los hombres se encuentran representados con puntos azules, mientras que las mujeres con puntos rosas.

Con relación a las personas que consumen cerdo de manera habitual y aquellas que no lo hacen (Fig. 15), quedó demostrado que existen diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$) entre la forma en que evaluaron ambas poblaciones. Las personas que no consumen cerdo de manera habitual, tuvieron mayor gusto por la formulación AF3, con inulina de achicoria en su formulación. Estos resultados demostraron que los consumidores percibieron la formulación como un producto listo para comer, en lugar de un alimento de cerdo tradicional.

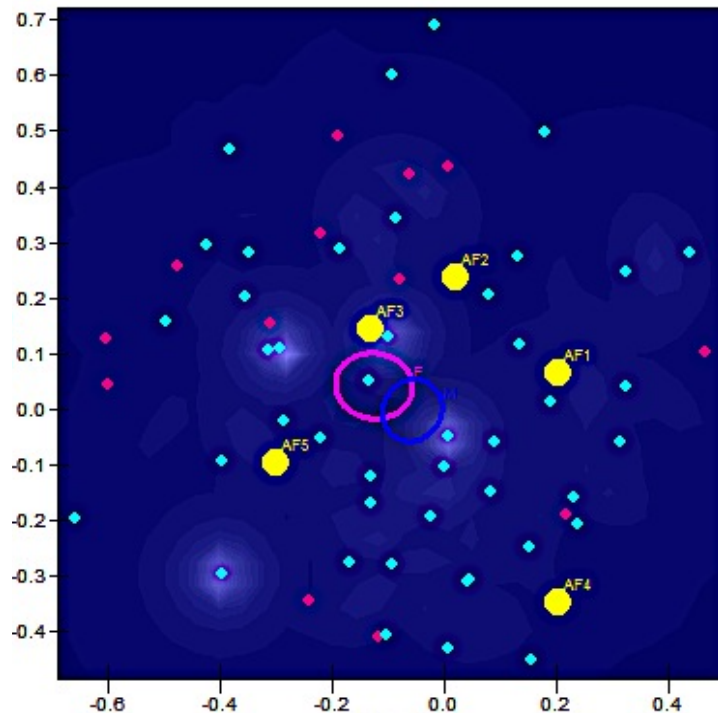


Figura 14. Efecto de género sobre la preferencia de las formulaciones mediante el método de segmentación.

Donde: Azul: Hombres; Rosa: Mujeres.

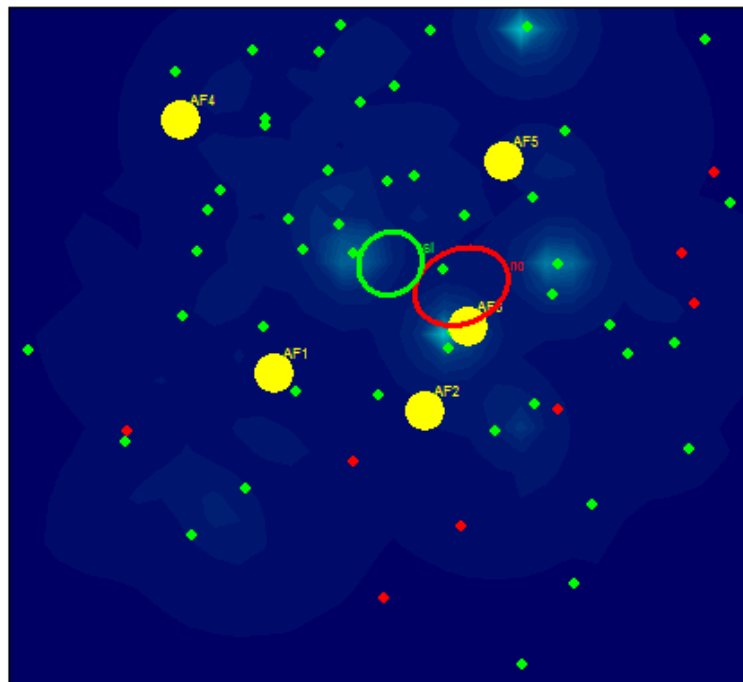


Figura 15. Efecto del consumo habitual de cerdo sobre el gusto de las formulaciones de marinadas analizadas mediante la técnica de segmentación.

Donde: Verde = consume cerdo de manera habitual; Rojo= no lo consume de manera habitual.

Se evaluó si existían diferencias entre aquellos que consumían alimentos con chile de manera habitual y aquellos que no lo hacían (Fig. 16), se pudo apreciar que no existen diferencias significativas entre estas variables. Se ha visto que, en el mercado de productos marinados, existen muy pocos productos donde se incorpora el chile.

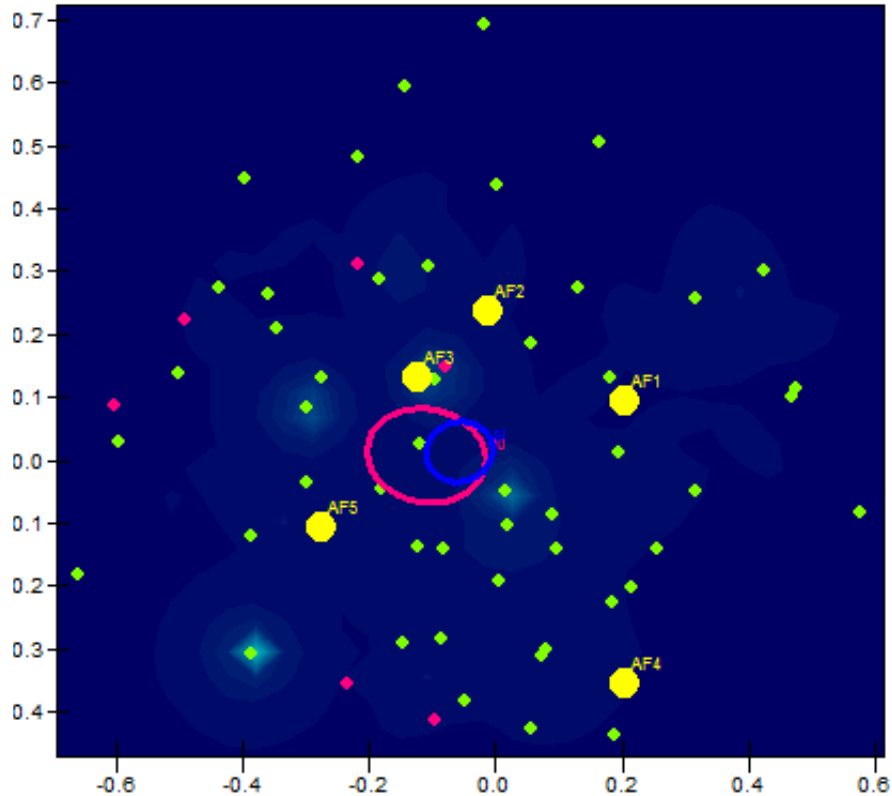


Figura 16. Efecto del consumo habitual de alimentos con chile sobre el gusto de las formulaciones de marinadas analizadas mediante la técnica de segmentación.
Donde: Verde = consume alimentos con chile ; Rojo= no consume chile de manera habitual.

La técnica de segmentación puede predecir de acuerdo al gusto de los consumidores las características de una formulación ideal. El óptimo de acuerdo al gusto de los consumidores se observó en la Figura 17, marcados de color rojo, posicionado de manera muy cercana a la formulación AF3. Lo anterior concuerda con los resultados presentados previamente.

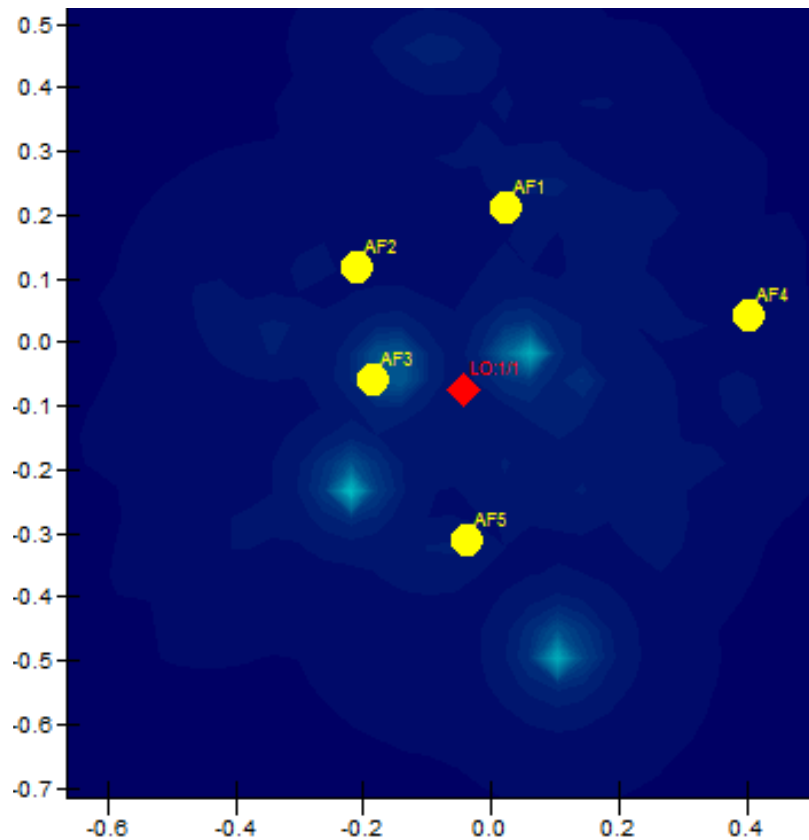


Figura 17. Predicción de la formulación óptima por medio de la técnica de segmentación mediante el gusto de los consumidores.

6.1.1.2.2. Análisis de Justamente Correcto (JAR) y Prueba de Penalidades.

En la Figura 18 se muestran las gráficas de justamente correcto de cada una de las cinco formulaciones analizadas con relación a los atributos clave para este tipo de productos. La técnica “justamente correcto” (JAR) se ha utilizado para analizar los atributos que se consideran más importantes en un determinado alimento. Se utiliza una escala donde el centro es considerado como **justamente correcto**, inferior a esto el producto tiene poco del atributo evaluado y viceversa. De tal forma que un producto ideal tendría que tener todos sus atributos evaluados como justamente correctos. Por ejemplo, se ha publicado un estudio donde utilizan las pruebas de las técnicas JAR para evaluar el uso de endulzantes naturales en la elaboración de yogures y para indicar la concentración adecuada de las mismas (Narayanan *et al.*, 2014).

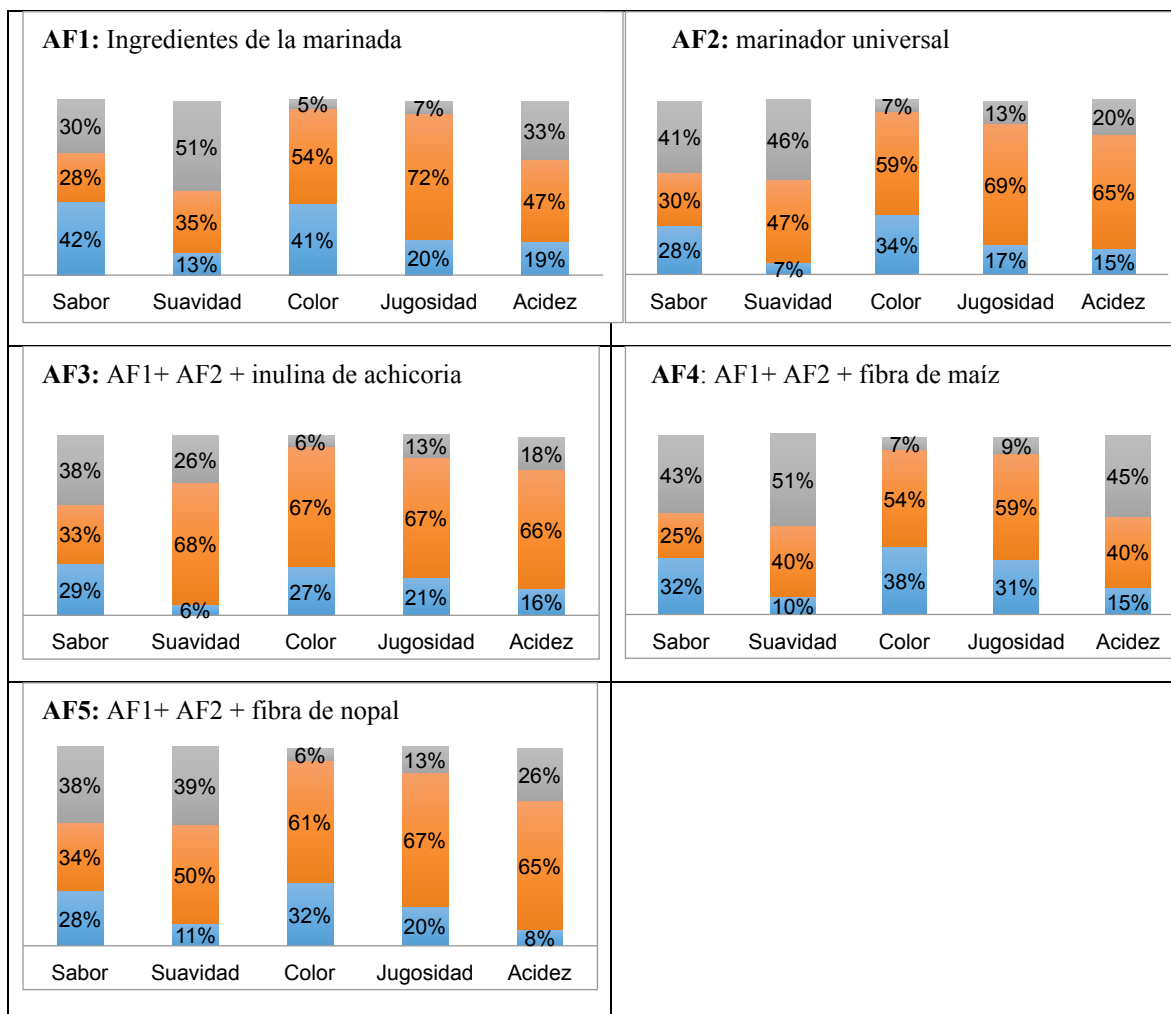


Figura 18. Porcentaje de justamente correcto en cada uno de las formulaciones analizadas. Donde: El color azul indica que se tiene poco de este atributo, el rojo representa que el atributo esta justamente correcto y el gris que se tienen demasiado del atributo estudiado; n= 205.

En el caso de la muestra AF1 que se refiere solo a utilización de los componentes de la marinada se observa que en cuanto al sabor, suavidad, color y acidez solo el 28%, 35%, 54% y 47% de los encuestados la consideraron justamente correcta, lo que la pone en desventaja al compararla con las demás formulaciones. Es decir, que un producto 100% natural no sería viable para ser escalado a nivel comercial.

Por otro lado, la formulación AF2 que únicamente tenía los ingredientes base (IB) de la formulación (ingredientes de la marinada + el aditivo comercial) mostró un incremento en los porcentajes justamente correctos, esto se observó en cuanto al atributo de

suavidad, lo que era esperado debido a que los fosfatos suavizan la carne, además de incrementar la acidez (Fig. 18).

La formulación AF3, se desarrolló utilizando los IB y la inulina como prebiótico, mostró ser el mejor tratamiento de todos los analizados, ya que los valores de justamente correcto se encuentran por arriba de 65% en suavidad, color, jugosidad y acidez. Es por tal motivo, que esta formulación puede ser la adecuada para elaborar el prototipo de este experimento. Estos resultados estuvieron acordes con los resultados obtenidos en la técnica de segmentación presentada previamente (Fig. 18).

La formulación AF4 se elaboró utilizando los ingredientes base y la fibra soluble de maíz como prebiótico, puede observarse que en el atributo de sabor los porcentajes de JAR fueron menores al compararlos con la formulación AF3, obteniendo solo un 25% de porcentaje de JAR. Esta disminución en los porcentajes de JAR se observó en todos los atributos evaluados, registrándose porcentajes por debajo del 60% en todos los casos (Fig. 18).

Finalmente, en la formulación AF5 se utilizó fibra de nopal en su elaboración y se obtuvieron porcentajes altos de JAR, en tres de los atributos estudiados: color, jugosidad y acidez con valores mayores al 60%; sin embargo, en suavidad y sabor los valores estuvieron por debajo del 50% (Fig. 18).

En la realidad, obtener todos los atributos JAR con un valor adecuado, no ocurre, lo que da lugar a que se puedan establecer reformulaciones basadas en determinados ingredientes. Por ejemplo, esta prueba se ha utilizado para evaluar el cambio de ingredientes clave en marinadas de pollo (Jarvis *et al.*, 2012), en particular al incluir tratamientos con fibra. Existe otro estudio, donde Hong *et al.* (2011), evaluaron distintos atributos sensoriales relacionados con diferentes porcentajes de ingredientes en formulaciones de res marinadas mediante el análisis de JAR, encontrando que este tipo de pruebas son adecuadas para este tipo de productos, ya que se obtiene información adecuada para conocer y tomar decisiones en relación a lo que los consumidores están buscando.

Sin embargo, al evaluar el criterio adecuado para la formulación adecuada podemos tomar en cuenta la investigación de Popper (2014) que indicó que si un 75% de los consumidores calificaba a todos los atributos del producto como JAR, se podría tomar la decisión de aceptarlo como una formulación viable para ser escalado; pero este porcentaje depende del tipo de producto alimenticio que se este analizando. Por ejemplo, para confeccionar un helado se espera un 80% de JAR para aceptar el producto y en el caso de productos lácteos bajos en grasa de un 60%.

Se realizó un análisis estadístico para analizar la información recabada como datos paramétricos; para lo cual se aplicó una prueba t student ($\alpha \leq 0.05$) donde se evaluó si las muestras utilizadas fueron JAR en cuanto a su formulación en general, es decir, si la media de las mismas concordaba con el término **justamente correcto** ($\mu=3$). Los resultados mostraron que no existe tratamiento que sea JAR, es decir, que su media sea igual a 3. Las medias de las formulaciones fueron las siguientes: AF3 ($\mu=2.87$) > AF2 ($\mu=2.86$) > AF5 ($\mu=2.81$) > AF1 ($\mu=2.61$) > AF4 ($\mu=2.52$).

Adicionalmente, se realizó una prueba de ANOVA para establecer si existían diferencias entre formulaciones, encontrándose diferencias significativas entre ellas ($\alpha \leq 0.05$); por lo que se realizó la prueba de Tukey para establecer cuales eran los tratamientos distintos (Anexo B). Al comparar la formulación AF3 (en virtud de tener una media más cercana a justamente correcto) con el resto de las formulaciones de estudio, se observó que no existen diferencias estadísticas al compararla con la AF2 y AF5. Sin embargo, son distintas estadísticamente con las formulaciones AF1 y AF4. Al comparar los resultados previos con los obtenidos mediante esta prueba, se pudo establecer que mediante las pruebas de LSA y de JAR se puede definir a la mejor formulación como la AF3, sin embargo, cabe señalar que mediante pruebas estadísticas no adecuadas estas diferencias no pueden ser detectadas, ahí radica la importancia de utilizar técnicas sensoriales poderosas de análisis.

Tomando en cuenta toda la información sensorial obtenida, se puede claramente identificar a la mejor formulación estudiada como la AF3, correspondiente a la que contenía inulina de achicoria como ingrediente funcional.

La inulina es un prebiótico, ya que se ha demostrado que las bacterias probióticas (bifidobacterias y lactobacilos) dentro del colon pueden fermentarla produciendo ácidos orgánicos de cadena corta que dan como resultado un efecto reductor de lípidos y de colesterol; por lo tanto, funcionan para disminuir el riesgo de hipertensión. Adicionalmente, su consumo se ha visto relacionado con la absorción de iones en el torrente sanguíneo como Fe, Mg, Ca y Zn. Además, favorece tanto al sistema inmune como al digestivo (González-Herrera *et al.*, 2015).

Desde el punto de vista tecnológico, la incorporación de inulina en la industria de alimentos se ha llevado a cabo con éxito en productos como: yogures, cereales, postres, barras nutritivas, helados, chocolates, pastas, entre otros. Ha sido utilizada como sustituto de grasa y azúcares, como emulsificante y estabilizador de espumas (González-Herrera *et al.*, 2015). Su incorporación en algunos derivados cárnicos, ha contribuido en particular para reducir el contenido de grasa en las formulaciones y potenciar sus características texturales y sensoriales (Muñoz Ohmen *et al.*, 2014); por ejemplo, Ruíz Martínez y Pacheco-Delahaye (2007), elaboraron dos formulaciones de salchichas bajas en grasas utilizando como sustitutos: 3.5% de inulina y 1.8% de carragenina, demostrando que es posible mantener las características sensoriales adecuadas, además de obtener un producto prebiótico.

Analizando con detalle la formulación AF3 (la cual contenía inulina), se procedió a evaluar cada una de las pruebas sensoriales aplicadas, a fin de poder caracterizar al producto cárnico, como puede observarse en la Figura 19, donde se presentan los resultados de las pruebas realizadas: de JAR, prueba de penalidades y un análisis estadístico para datos paramétricos (t student).

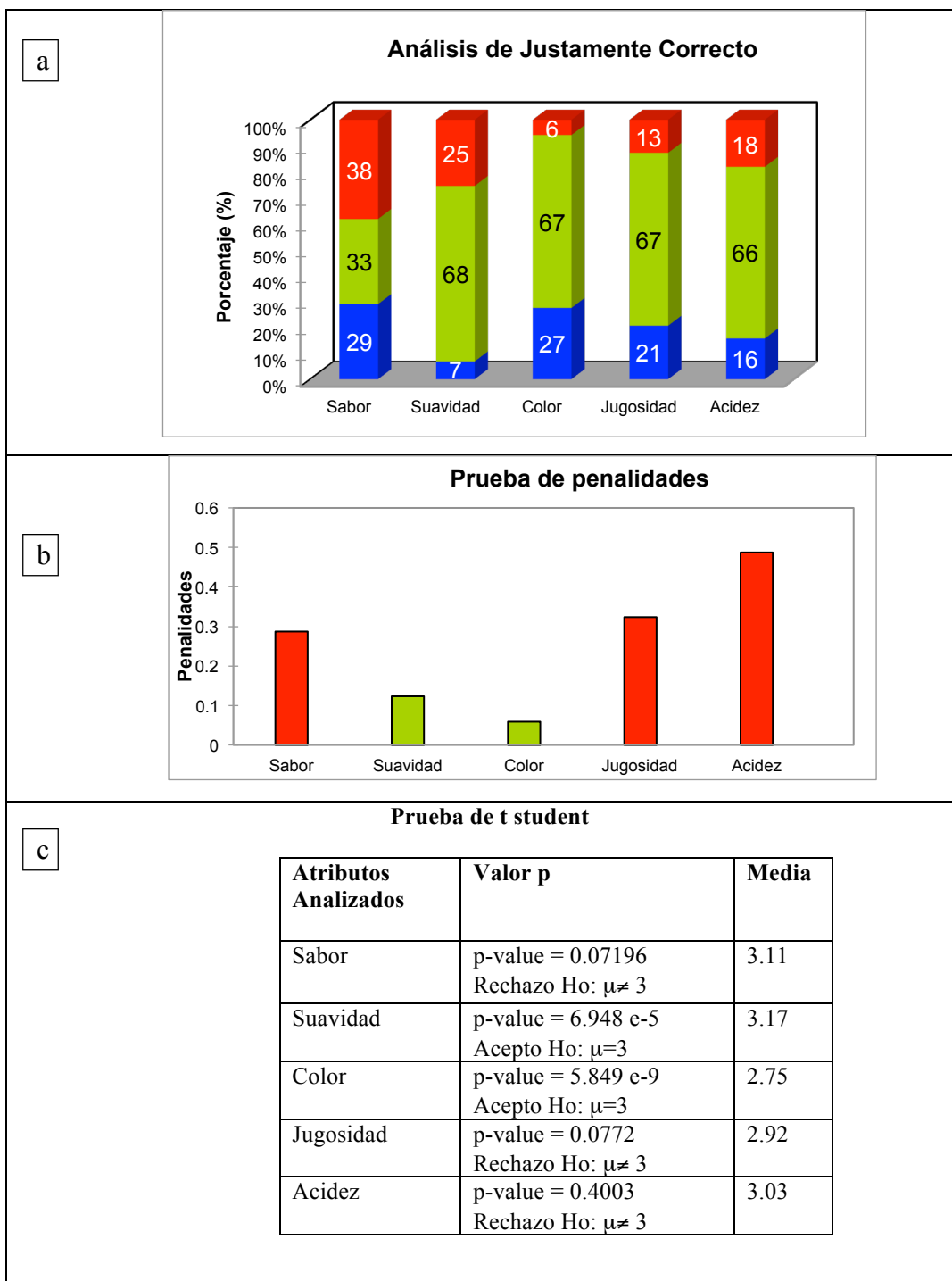


Figura 19. Comparación mediante distintas técnicas sensoriales de las características de la formulación seleccionada (AF3), el cual fue elaborado con inulina de achicoria. Porcentaje acumulado de los niveles justamente correcto de la formulación desarrollada. Donde: 1= poco, 2= justamente correcto y 3= mucho, (b) Prueba de Penalidades y (c) Pruebas t de student; n= 205.

En cuanto a la prueba JAR se puede observar (Figura 19 a) que en los parámetros de suavidad, color, jugosidad y acidez este porcentaje se encuentran por arriba del 66% que para este producto podría ser un porcentaje adecuado para escalamiento, sin embargo, es importante prestar atención al atributo de acidez.

La prueba de penalidades (Fig. 19 b), refleja a detalle que atributo contribuyó a que la formulación AF3 pudiera ser apreciada por el consumidor. Se basa en relacionar el gusto en general del producto y su escala de JAR. El objetivo de las pruebas de penalización fue priorizar los atributos en términos de gusto en general (Popper, 2014). Los resultados muestran que el valor más alto es la acidez, por lo que podría ser un parámetro a considerar en caso de hacer una reformulación a fin de disminuirla. Jarvis *et al.* (2012) establecieron que el utilizar fibra en productos de pollo marinado puede disminuir la jugosidad, sin embargo, esto es un efecto mínimo negativo, que no afecta la aceptación general de este tipo de productos. Estos análisis se compararon (Fig. 19 c), mediante una prueba t de student para cada uno de sus atributos evaluados, estableciendo que para los parámetros de jugosidad, acidez y sabor $\mu \neq 3$ con $\alpha \leq 0.05$, de tal manera, que se observa que se corroboró lo encontrado en la prueba de penalidades.

Se analizó la matriz de correlación de Spearman (Tabla 13), para entender que tan relacionadas estaban las variables entre sí, encontrándose que en este tipo de productos la aceptabilidad esta relacionada con el color, suavidad y acidez.

Tabla 13. Matriz de correlación de Spearman de la formulación desarrollada con inulina.

Variabes	Aceptabilidad Ponderada	Sabor	Suavidad	Color	Jugosidad	Acidez
Aceptabilidad Ponderada	1	0.182	-0.066	-0.105	-0.162	0.015
Sabor	0.182	1	0.317	-0.178	-0.045	0.152
Suavidad	-0.066	0.317	1	-0.005	0.193	-0.056
Color	-0.105	-0.178	-0.005	1	0.307	0.036
Jugosidad	-0.162	-0.045	0.193	0.307	1	-0.054
Acidez	0.015	0.152	-0.056	0.036	-0.054	1

Los valores en negrita son diferentes de 0 con un nivel de significación alfa=0.05

Se evaluó finalmente, cómo se encuentran los valores de los atributos con respecto a la media, encontrándose que la mayor variación esta en tener demasiado sabor, esto puede apreciarse en la Figura 20. Todas estas pruebas permiten evaluar a la formulación seleccionada (AF3) con relación a sus atributos estudiados.

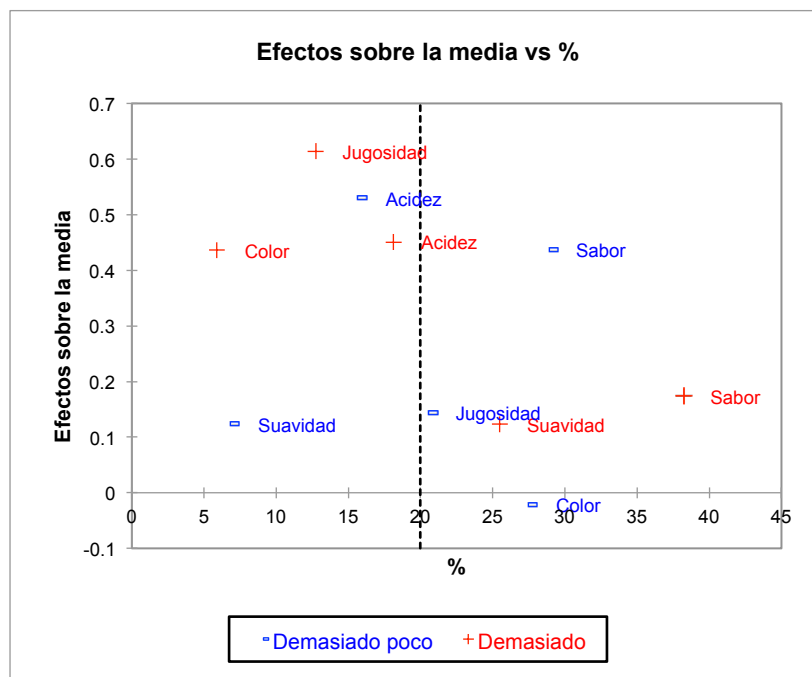


Figura 20. Efecto de los valores de media sobre el porcentaje de variación de los atributos estudiados mediante las pruebas de Justamente Correcto.

Otra manera de evaluar a los productos es comparar el grado de diferencia en términos de cada uno de sus atributos. El modelo thurstoniano, se basa en comparar un producto con relación a un ideal, estableciendo el índice d' como grado de diferencia entre productos, donde se miden las crestas de ambas curvas que indican la medida entre dos medias en términos de su desviación estándar, es decir, un valor más cercano a 0 significa que se encuentra más cercano al ideal (Álvarez-Coureaux y Manresa-González, 2012).

En la Figura 21 se muestran todos los atributos analizados por esta técnica evaluando la formulación seleccionada AF3 con relación al resto. Se observó que AF3 en cuanto a los atributos de textura (0.35), color (0.59) y jugosidad (0.28) presentó valores más cercanos al óptimo (0).

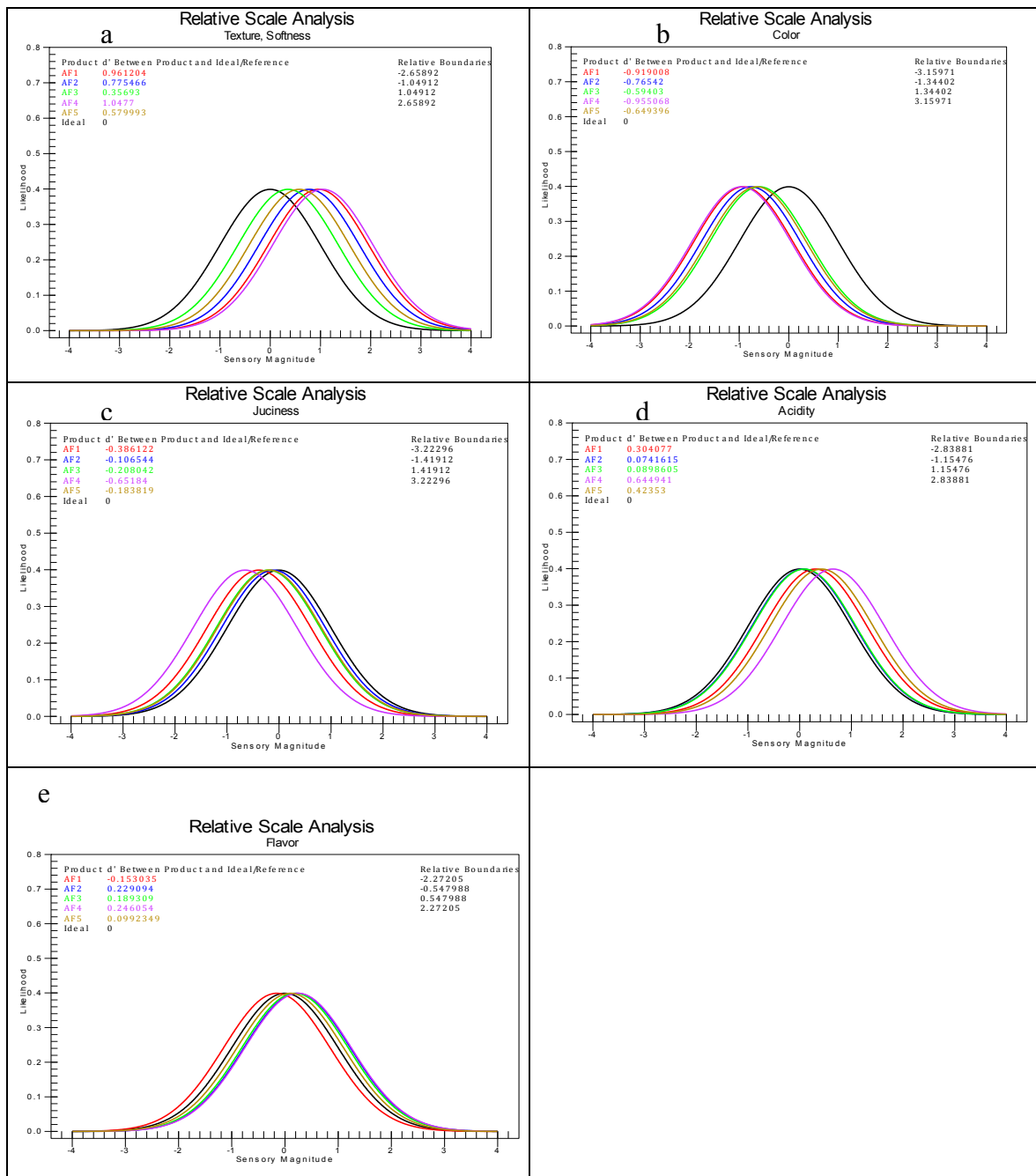


Figura 21. Análisis de datos JAR mediante modelos thurstonianos. Los Atributos estudiados: (a) sabor, (b) suavidad, (c) color, (d) jugosidad y (e) acidez. Donde el valor 0 es el ideal y entre más alejados se encuentren las muestras analizadas significa que el producto no es JAR.

En cuanto al atributo del sabor, AF3 es la segunda más cercana al óptimo, ya que presentó un valor de 0.18 vs. 0.099, que se observó en la formulación AF5. Finalmente,

en cuanto a acidez la formulación AF3 fue la segunda más cercana al óptimo, presentando un valor de 0.07 al compararla con 0.08 de la formulación AF2.

Este análisis de datos corroboró una vez más que la mejor formulación para utilizarla como el prototipo es la AF3, que fue elaborada mediante la inulina de achicoria.

Dentro del cuestionario aplicado a los consumidores evaluados, el 29% de los mismos contestó que preferían la formulación AF3 que fue elaborada con inulina de achicoria (Fig. 22). Con este resultado se confirmó una vez más lo encontrado mediante los otros métodos sensoriales utilizados para esta selección.

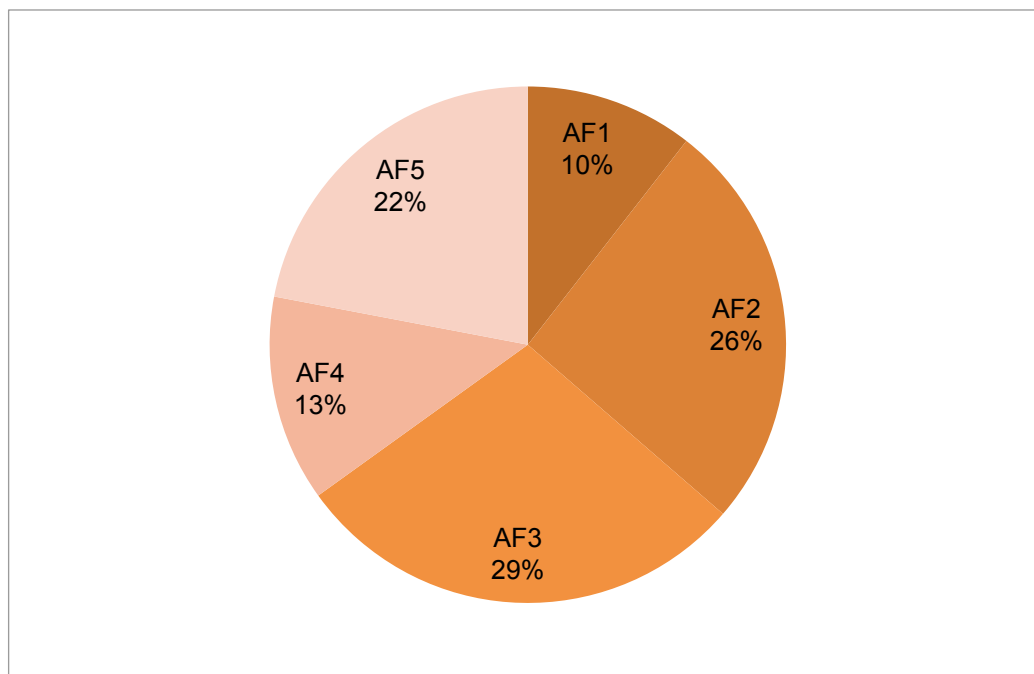


Figura 22. Formulación preferida por los consumidores representado en términos de porcentaje.

6.3. Reformulación para establecer el prototipo cárnico funcional.

Con base en lo anterior se procedió a realizar una reformulación del AF3, lo que se llevó a cabo de acuerdo a lo establecido en la Tabla 9. La diferencia de esta se basa en aumentar la inulina en la formulación a fin de garantizar que el producto fuera funcional y que cumpliera con la norma NOM 086-SSA1-201 para ser declarado como una buena fuente de fibra. Con esta reformulación se garantizó que el porcentaje de inulina

presente en la marinada (2.5%) fuera la adecuada para ser considerado como prebiótico. Además, el producto final (carne, marinada, cultivo iniciador e inulina), tiene 2.87% del total de prebiótico. Muñoz Ohmen *et al.* (2014) añadieron inulina a las marinadas que prepararon para pechugas de pollo y realizaron pruebas sensoriales, sin embargo, ellos no encontraron diferencias significativas relacionadas con la cantidad de inulina añadida en la formulación.

Por otro lado, tomando en cuenta los resultados obtenidos en el análisis sensorial, donde los consumidores establecieron que era un producto muy ácido se procedió a disminuir el porcentaje de vinagre de 7.29% a 2.87%. Finalmente, se agregó un poco de pimentón para dar color rojo (2.12%). Los productos líderes en el mercado de Aguascalientes, que se refieren a carne de cerdo marinados son típicamente de color rojo. Uno de los factores más determinantes en carne, durante el procesamiento y el almacenamiento es que se producen cambios en este atributo, los cuales se dan por factores como el oxígeno, la acidez y la exposición a la luz, y este cambio de color es un parámetro de importancia utilizado por los consumidores para determinar la compra del producto (Potter y Hotchkiss, 2007).

Todo cambio en una formulación debe ser abordado tanto en su análisis sensorial como en su composición. Sin embargo, para poder escalar el producto, la evaluación debe comparar las marcas líderes del mercado, con el fin de asegurar una buena aceptación del mismo.

6.3.1. Análisis sensorial del prototipo final

La reformulación fue primeramente comparada con los productos líderes del mercado de Aguascalientes. Se observó (Fig. 23) que la marca mejor evaluada fue la 6 (8.01 ± 1.5), seguida por la marca 2 (7.68 ± 1.7). Posteriormente, estuvo mejor posicionada el prototipo desarrollado (Marca 1) que tiene una aceptación general por parte de los consumidores de (7.25 ± 1.59). Considerando que esta tiene buena aceptación por parte de los consumidores en el Estado de Aguascalientes.

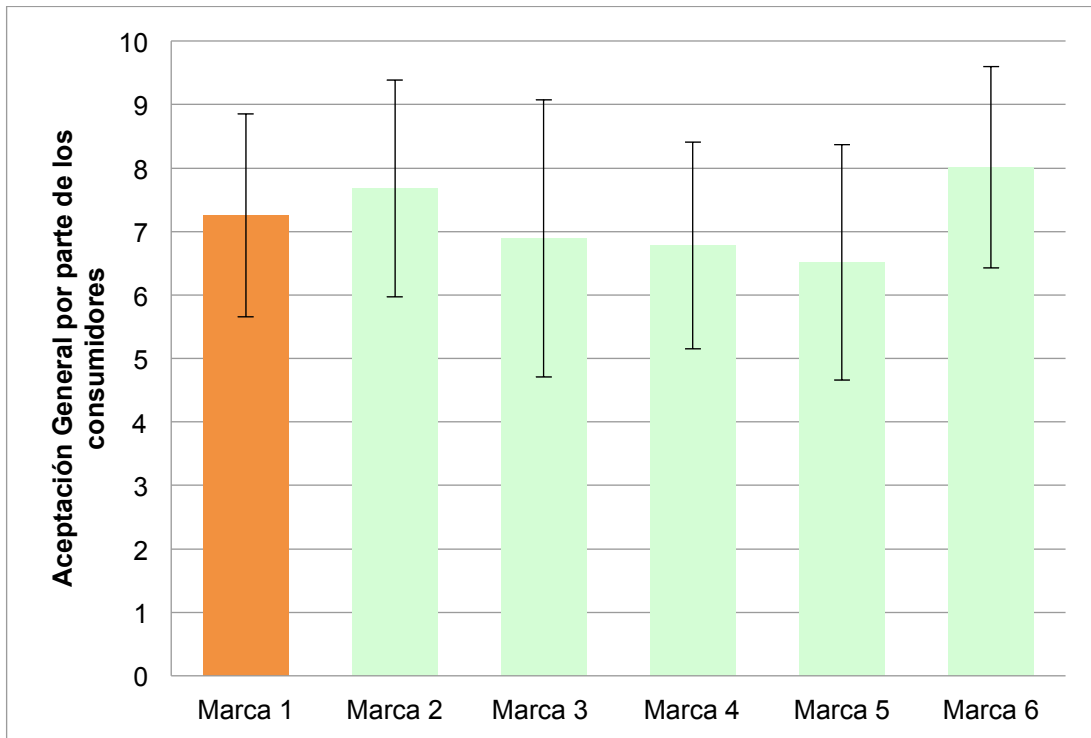


Figura 23 . Aceptación general (escala del 1 al 10) del prototipo (Marca 1) en comparación con el resto de las marcas líderes en Aguascalientes.

En la Figura 24 se presenta un análisis de segmentación, los resultados revelaron que existen varias regiones óptimas de acuerdo a los gustos de los consumidores, estas zonas pueden observarse al ver las manchas más oscuras. El prototipo desarrollado (Product 1) esta cercano al segmento más oscuro, lo que significa que satisfizo los gustos de los consumidores. Se observó que otros productos están cercanos de otros segmentos con alta densidad (productos 2, 4 y 6), estas zonas representan la distribución de calificaciones de gusto de cada uno de los consumidores estudiados (Delwiche, 2007). Los productos 3 y 6 se encuentran lejos de estas zonas consideradas como las "óptimas".

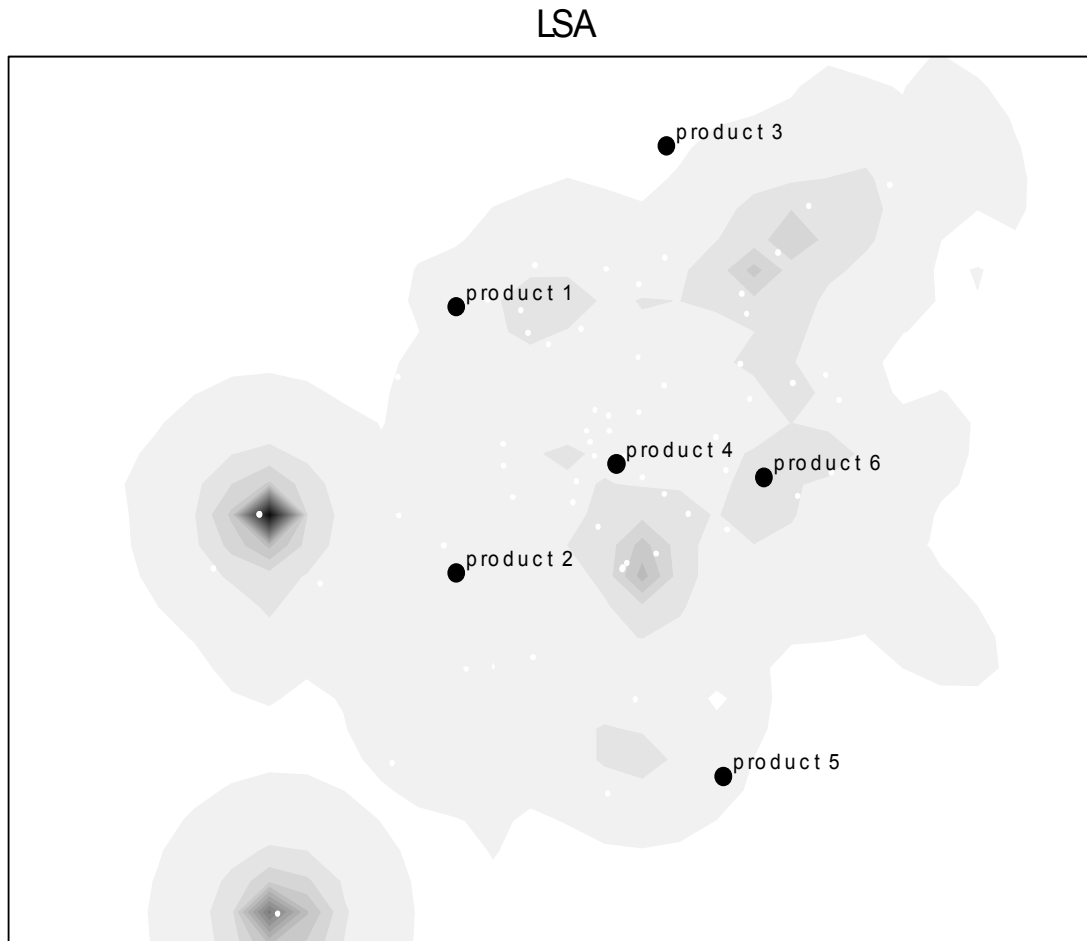


Figura 24. Análisis de Segmentación (LSA) de cinco productos líderes en el mercado comparados con el prototipo desarrollado (Producto 1).

El análisis de segmentación puede incluir información relacionada con los atributos analizados, donde se da información de cuales de estos tienen mayor influencia sobre la percepción del producto, estos se conocen como conductores de agrado. Los resultados muestran que todos los atributos analizados excepto por el olor, sabor y textura tienen ($\alpha \geq 0.05$) efecto sobre el gusto de los consumidores por el producto, como puede ser observado en la Figura 25 y en la Tabla 14. La correlación que existe entre estos productos es mayor a 0.9 en acidez, sal y jugosidad.

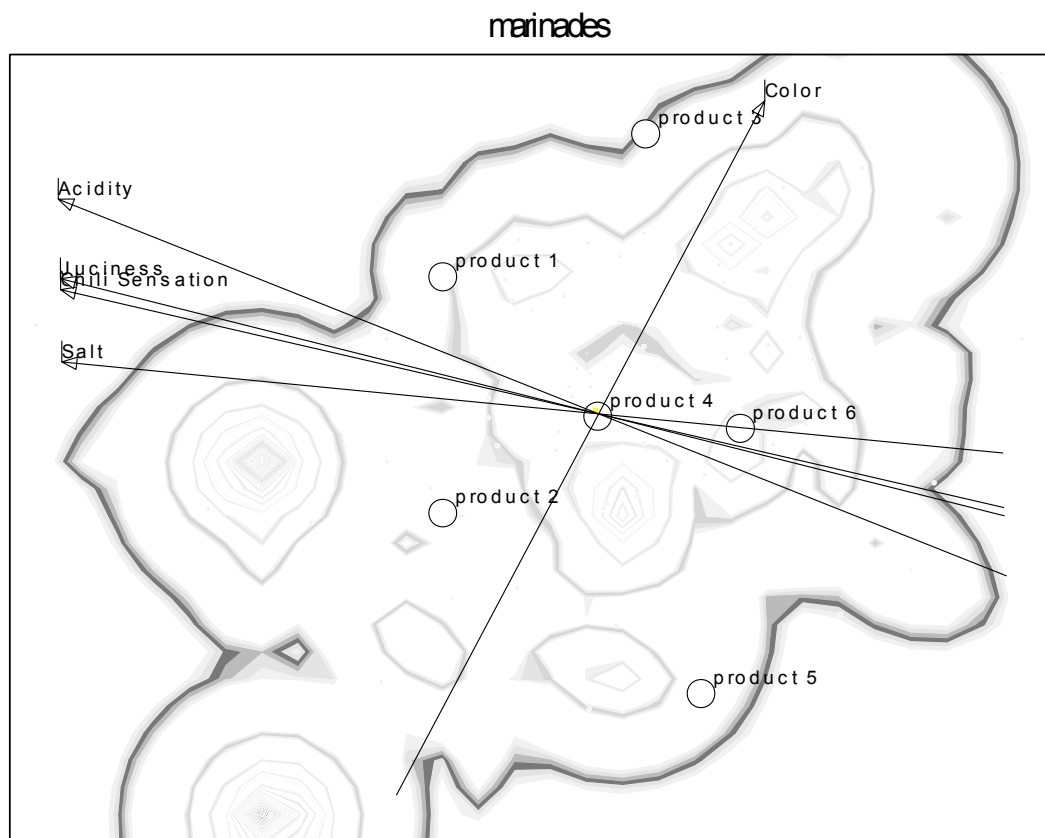


Figura 25. Análisis de Segmentación (LSA) basado en el gusto de los consumidores, donde se analizan el prototipo desarrollado y se comparan con 5 marcas comerciales.

Tabla 14. Correlación entre los atributos analizados del prototipo desarrollado.

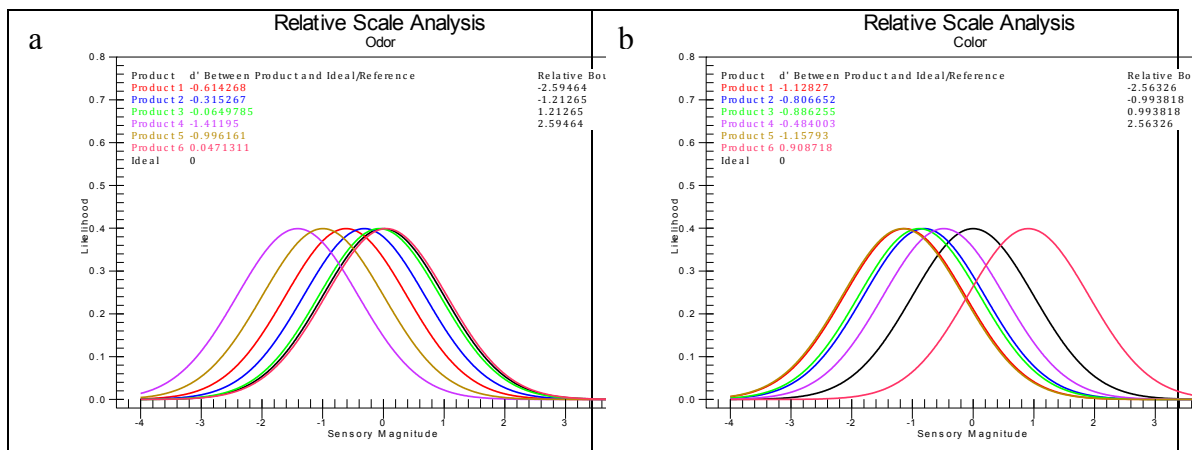
Escala	Correlación	p-value
Olor	0.76	0.0739
Color	0.87	0.0218
Acidez	0.90	0.0124
Sensación picante	0.88	0.0178
Sal	0.89	0.0147
Sabor	0.72	0.1010
Jugosidad	0.93	0.0055
Textura	0.79	0.0574

Mediante el análisis de JAR, se pudo establecer si el producto es adecuado en todos los atributos estudiados o si requiere menos o más de un determinado atributo, que puede estar relacionado con algún ingrediente en la formulación (Li *et al.*, 2014; Lawless, 2013). Sin embargo, el hecho de cambiar un ingrediente podría cambiar la aceptación general del producto (Lawless, 2013). Los datos obtenidos mediante JAR se analizaron

con los modelos thurstonianos, donde el valor de d' es calculado entre cada una de las medias de los productos estudiados al compararlos con el ideal que esta posicionado en el centro, es decir el 0 es el ideal, entre más alejado estén a este punto pueden estar más alejados del término JAR. Los atributos medidos fueron color, olor, acidez, sensación chilosa, sabor salado, sabor a jamaica, jugosidad y textura.

Al analizar los valores de d' observados en la Figura 26, se mostró que en cada uno de los atributos del prototipo desarrollado (product 1) se obtuvieron valores menores de 1 en: olor (0.60), acidez (0.66), sensación salada (0.42), sabor a jamaica (0.60) y textura (0.92); por lo que podemos decir que los atributos fueron muy cercanos al término JAR de acuerdo a la percepción del consumidor.

Se obtuvieron valores mayores a 1 de d' en los atributos de color, sensación chilosa y jugosidad. Respecto al color en productos cárnicos, este siempre ha sido un tema que se ha tenido que analizar con mucho cuidado, ya que es asociado con frescura y los consumidores prefieren un producto marinado rojo, aunque se este hablando de un producto marinado de cerdo. En cuanto a la sensación chilosa todos las marcas presentaron un valor d' mayor a 1: producto 1 (-1.40), producto 2 (-2.20), producto 3 (-2.15), producto 4 (-2.42), producto 5 (-2.43) y producto 6 (-1.19). Finalmente, en cuanto a la jugosidad, se podrían evaluar algunas circunstancias que estén asociadas con este parámetro a fin de poderlo mejorar.



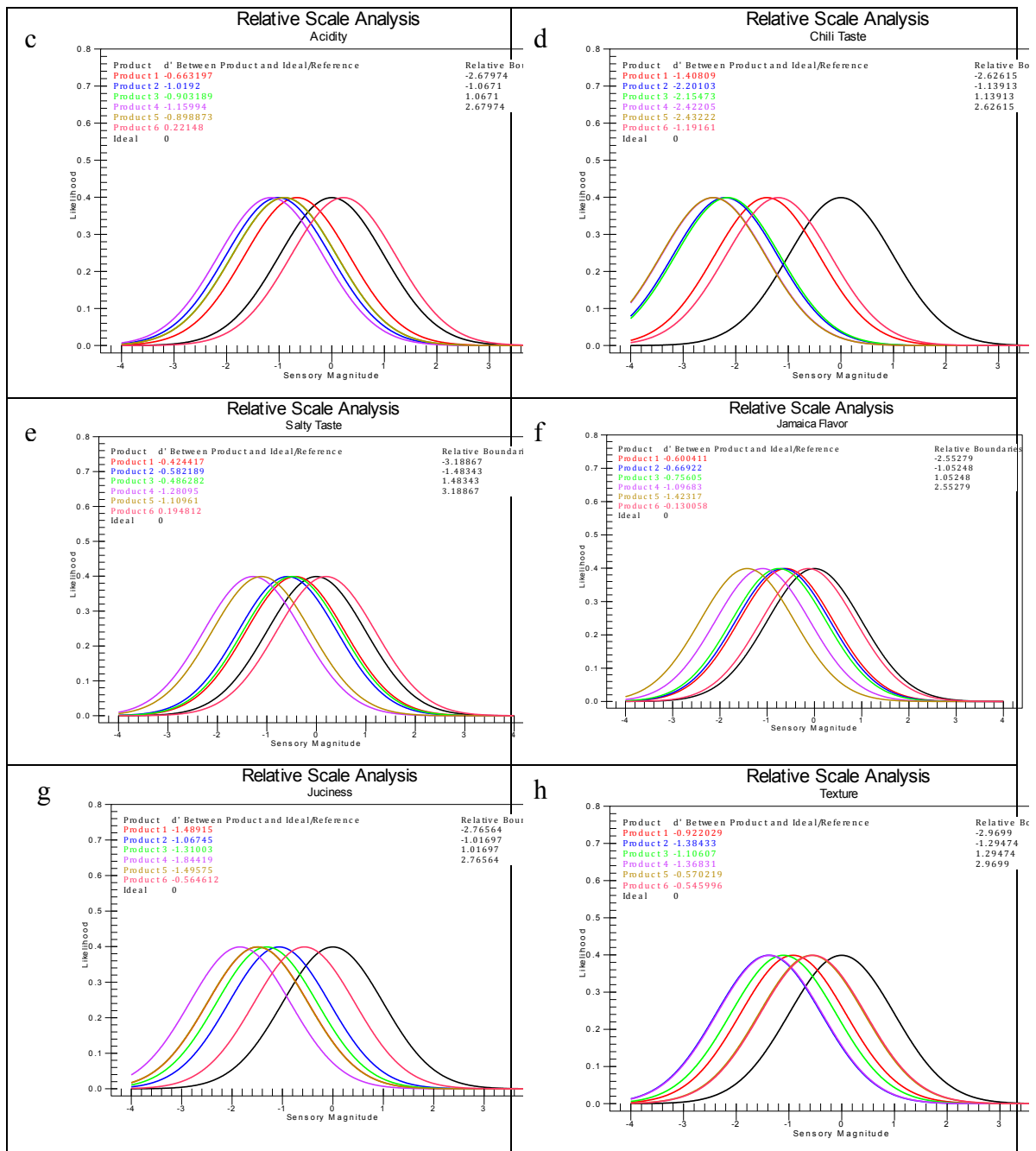


Figura 26. Análisis de datos JAR mediante modelos thurstonianos.

Donde: (a) olor, (b) color, (c) acidez, (d) sabor a chile, (e) sabor salado, (f) sabor a jamaica, (g) jugosidad, (h) textura.

El producto 1 se refiere al prototipo desarrollado en el laboratorio el resto son marcas líderes en el mercado de Aguascalientes.

Por último, se aplicó una técnica sensorial conocida como CATA (sus siglas en inglés son Check all that apply), en la que se pide a los consumidores que marquen todos los atributos que detectan en los productos analizados. Para esta prueba se seleccionaron 5 atributos positivos y 5 negativos. Los resultados revelaron que en el prototipo los atributos positivos, firmeza adecuada y buen olor, fueron los atributos percibidos por los consumidores en un 32% y 31% respectivamente (Tabla 15).

Tabla 15. Frecuencia de atributos positivos encontrados en cada una de las marcas evaluadas

Producto	Color Natural	Sabor a Chipotle	Firmeza adecuada	Jugosidad	Buen Olor
1	22%	21%	32%	16%	31%
2	32%	6%	31%	29%	23%
3	32%	9%	35%	20%	32%
4	22%	8%	26%	13%	24%
5	18%	4%	27%	11%	17%
6	30%	21%	37%	36%	25%

En la Tabla 16 se muestran los porcentajes correspondientes a los atributos negativos encontrados en el prototipo, observándose que los atributos de color oxidado y de sensación de seco son los que predominan con un 21% y 27%, respectivamente. Estos resultados están completamente relacionados con el valor d' , en los cuales se ha discutido que se pudiera mejorar la formulación en cuanto a color y jugosidad a fin de que el prototipo desarrollado pudiera aumentar todavía más su aceptación.

Tabla 16. Frecuencia de atributos negativos encontrados en cada una de las marcas evaluadas.

Producto	Insípido	Ácido	Seco	Color Oxidado	Pastoso
1	4%	12%	27%	21%	8%
2	7%	6%	12%	14%	9%
3	11%	9%	27%	15%	12%
4	22%	9%	31%	14%	17%
5	14%	11%	30%	20%	18%
6	6%	22%	13%	8%	12%

Es importante recalcar que con las características sensoriales que tiene el prototipo actualmente, se puede establecer que es adecuado para el escalamiento industrial.

El programa IFPrograms™ predice con base en la percepción dónde debe estar posicionado un nuevo prototipo en caso de que se decida ampliar el portafolio de productos, el cuál está marcado como un punto rojo en la Figura 27. Sin embargo, cabe destacar que el prototipo desarrollado en el laboratorio para este trabajo experimental tiene una buena aceptación; por lo que no sería necesaria una reformulación pero se deberá prestar atención a los parámetros de color y sabor seco.

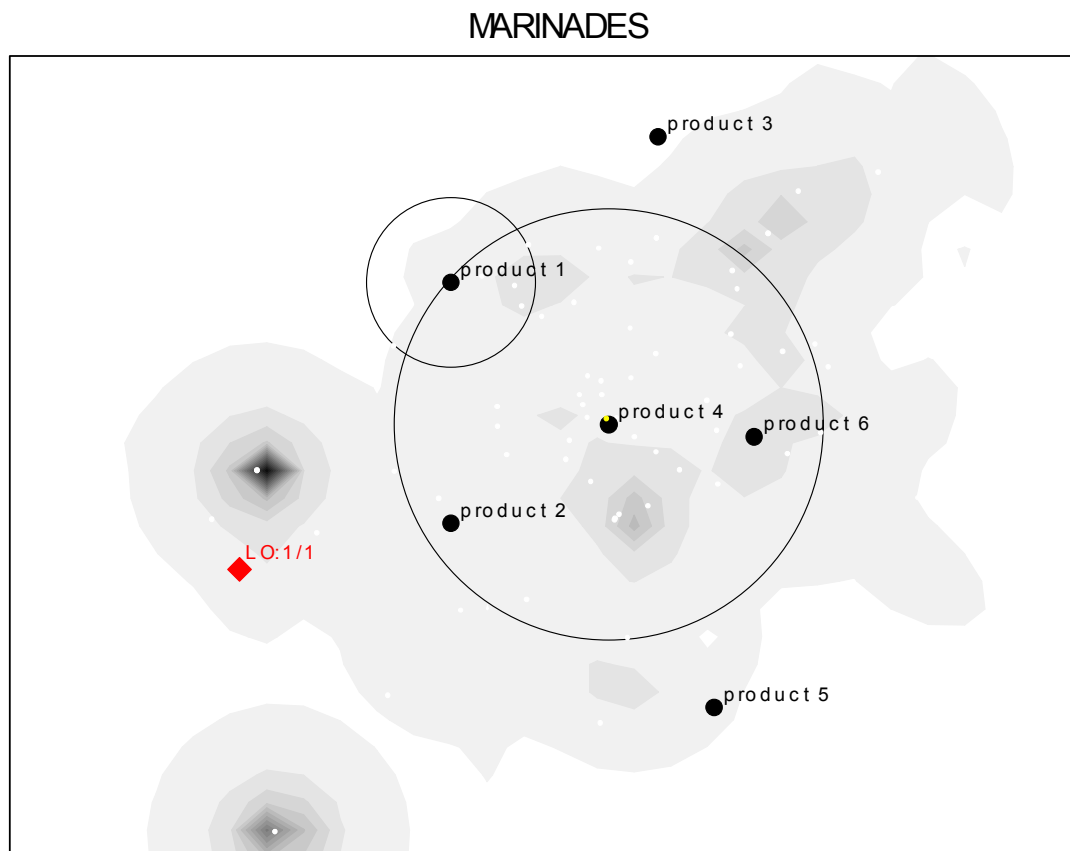


Figura 27. Análisis de segmentación para desarrollar otro prototipo (punto rojo) basado en el gusto de los consumidores, donde se analiza el prototipo desarrollado y se compara con 5 marcas comerciales.

6.3.2. Análisis bromatológico

La evaluación nutrimental presentada a continuación refleja la diversidad entre la composición que puede existir entre distintas marcas líderes de marinados de cerdo en el mercado, sobre todo al compararlo con el prototipo desarrollado en el laboratorio (Marca 1) como se muestra en la Figura 28. Esta prueba se realizó mediante la técnica de infrarrojo cercano, que se ha utilizado para predecir la calidad de carnes (Prevolnik *et al.*, 2004; Prieto *et al.*, 2009) con la ventaja de que no requiere preparación en las muestras, además de que es no destructiva (Porep *et al.*, 2015).

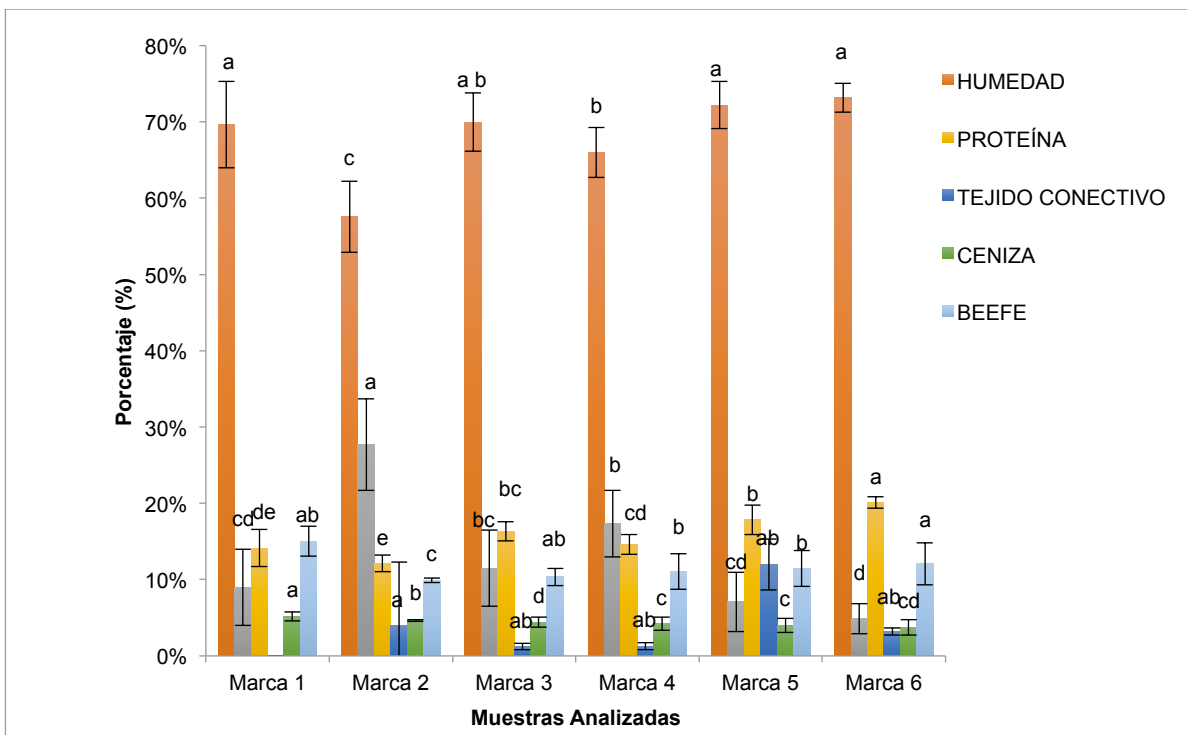


Figura 28. Composición bromatológica de las marcas de carne de cerdo marinadas líderes en Aguascalientes mediante la técnica de infrarrojo cercano.

Letras iguales significa que no existen diferencias estadísticas al aplicar ANOVA ($\alpha \leq 0.05$), $n=9$.

Donde: El prototipo es el producto 1. BEEFE = proteína - proteína del tejido conectivo.

Al analizar la grasa presente en los sistemas ($\alpha \leq 0.05$), se observó (Fig. 28) que las marcas que tienen menor grasa son las 6 y la 1 (Prototipo). En cuanto al contenido de proteína, la marca 6 mostró el valor más alto ($\alpha \leq 0.05$); pero es importante analizar paralelamente el valor de BEEFE, que se refiere a la proteína que es biodisponible,

donde se encontraron valores más altos en la marca 6, seguido por la marca 1 (Prototipo).

Las marcas que presentan mayor humedad ($\alpha \leq 0.05$) son la 6, 5, 1 y 3 (en orden descendente), que está asociado con la palatabilidad. Por otro lado, en cuanto a la ceniza se observaron cuatro grupos ($\alpha \leq 0.05$), el mayor es el desarrollado en el laboratorio (Marca 1), seguido por la marca 2. Existe un tercer grupo que esta formado por la marca 6 y 5; y finalmente la marca 4 y 3. Se ha reportado que la carne es una excelente fuente de minerales, sobre todo de hierro, zinc, sodio, potasio y magnesio; por lo que las diferencias entre tratamientos se podrían explicar debido a estos compuestos (Braña *et al.*, 2011).

De tal forma que el prototipo desarrollado en el laboratorio (Marca 1) puede ser considerado un producto con características nutrimentales comparables a las que presentan las marcas líderes que se comercializan en Aguascalientes.

El producto desarrollado en el laboratorio contiene inulina en una proporción de 2.5%. De acuerdo a la NOM 086-SSA1-201, que se refiere a los alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición, es decir, relacionado con las especificaciones nutrimentales, el producto puede ser declarado como **adicionado con fibra**. Tomando en cuenta la información establecida en la Figura 29, se procedió a realizar una etiqueta nutrimental de acuerdo a lo establecido en la NOM-051-SCFI/SSA1-2010 que se refiere a las especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasadas, dando como resultado la Figura 29. En esta se estableció las calorías por porción, y las calorías que representan el contenido de grasa. Así mismo, se muestra el porcentaje del valor diario de los principales componentes alimentarios. Se muestran además, los íconos nutrimentales, en los cuales se estableció el porcentaje del total del consumo diario basado en una dieta de 2000 Kcal. Con base en la información obtenida se procedió a realizar una etiqueta nutrimental aproximada.

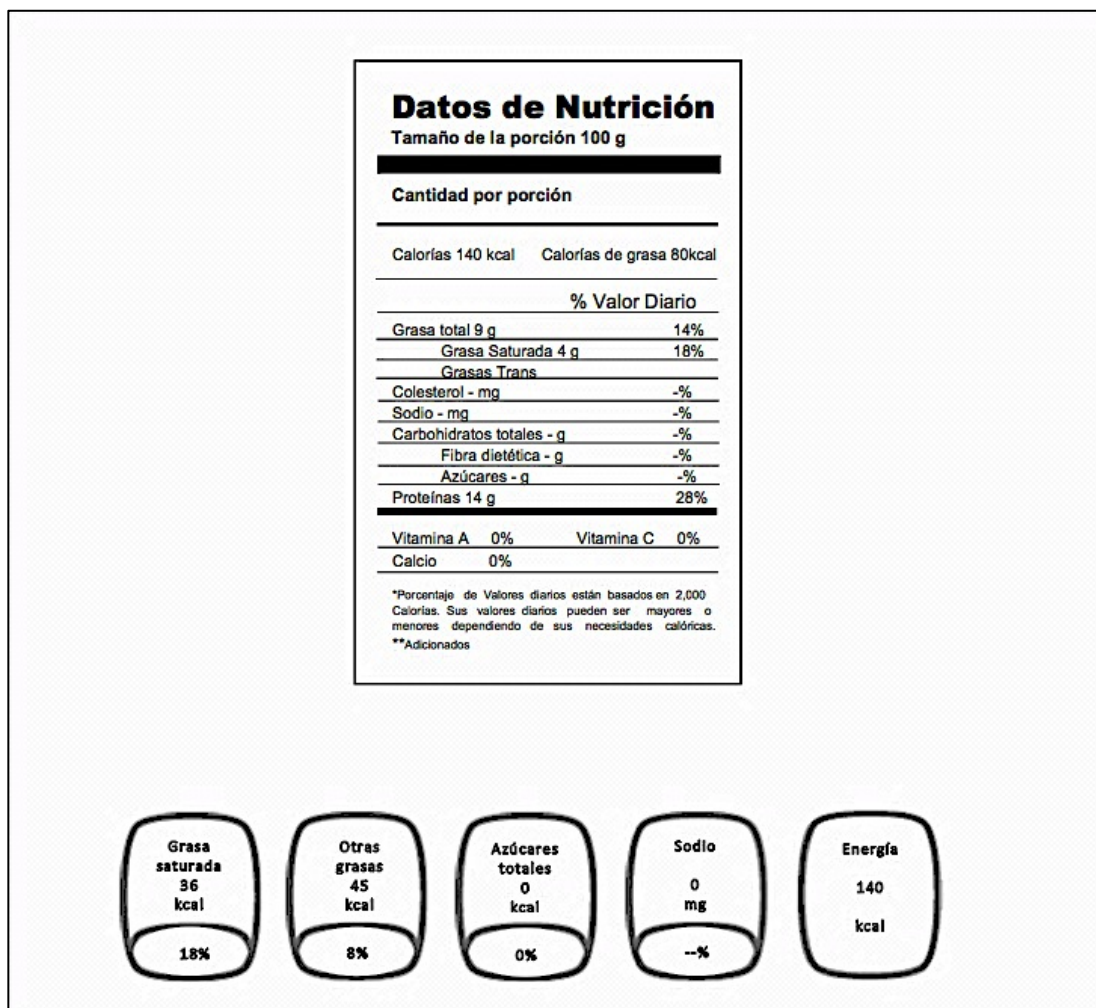


Figura 29. Etiqueta nutrimental del prototipo elaborado con inulina de achicoria. El porcentaje del valor diario se basa en una dieta de 2000 Kcal. Sus valores diarios pueden ser mayores o menores dependiendo de las necesidades calóricas.

Finalmente, el prototipo desarrollado, es un producto marinado, que cumple con la especificaciones señalada por la NOM-213-SSA1-2002 para este tipo de producto, referente a productos cárnicos procesados, que define a un producto marinado como aquel adicionado de sal u otros aditivos por vía seca o húmeda, excepto nitratos o nitritos, pudiendo ser cocidos o no.

Es importante mencionar que el prototipo es considerado un producto funcional con buenas características nutritivas y sensoriales por lo que es plausible su escalamiento; por un lado tiene un buen sabor y por otro es una excelente matriz para incluir

prebióticos. Siró *et al.* (2008) realizaron una revisión de las razones para desarrollar un producto funcional, además, del mercadeo del mismo y de la aceptación por parte del consumidor, donde se establece que la aceptación por parte de un producto funcional depende principalmente de la percepción del alimento que sirve como vehículo, en este caso la carne siempre es vista como nutritiva al grado de que por sí sola podría ser considerada como funcional. Sin embargo, la inclusión de prebióticos abre un sin número de opciones que deben ser exploradas.

6.4. Evaluación de índice prebiótico de los ingredientes utilizados en la formulación.

Se determinó el índice prebiótico (IP) de acuerdo a Palframan *et al.* (2003) basado en una relación entre el crecimiento de bacterias probióticas en una fuente de carbono determinada con respecto a un control. Este IP permite evaluar el efecto prebiótico *in vitro* por una bacteria probiótica y cuando se obtiene un valor mayor a 1 se considera que el grupo bacteriano muestra un incremento relativo mayor que el de la población bacteriana de referencia. El PI *in vitro* nos permite establecer cómo los prebióticos estudiados pueden crecer en nuestro tracto gastrointestinal. En la Tabla 17 se puede observar que se probaron las tres cepas de estudio y que únicamente la bacteria *Lb.* GG presentó crecimiento, ratificando su carácter probiótico. Un hallazgo importante es que las otras dos bacterias de estudio *Lb.* 1489 y *Lb.* 2772 no tienen esta característica probiótica.

Tabla 17. Crecimiento de bacterias en el medio simple utilizando los prebióticos

	Fibra de Nopal	Fibra de Maíz	Inulina
<i>Lb.</i> GG	√	√	√
<i>Lb.</i> 1489	ND	ND	ND
<i>Lb.</i> 2772	ND	ND	ND

ND: Crecimiento no detectado

En la Tabla 18 se muestra el índice prebiótico de cada uno de los ingredientes utilizados en la marinada. Los resultados señalan que el chile chipotle, presentó un índice prebiótico alto (2.30 ± 0.00). Se ha reportado adicionalmente que el chile chipotle tiene

actividad fenólica relacionada con una capacidad antioxidante (Ornelas-Paz *et al.*, 2010 y Moreno-Escamilla *et al.*, 2015).

Tabla 18. Índice prebiótico (IP) de ingredientes calculados de acuerdo a la ecuación modificada de Palfram *et al.*, 2003).

Ingredientes	Índice prebiótico
Fibra de nopal	0.50 ±0.00
Fibra de maíz	1.75 ± 0.01
Inulina	1.79 ± 0.06
Marinador	0.51 ±0.00
Chipotle	2.30 ±0.00
Jamaica	0.23 ±0.00
Ajo en polvo	2.24 ±0.06
Cebolla en polvo	0 ± 0.00
Romero molido	1.03 ±0.01

El ajo presentó un carácter prebiótico de 2.24 ± 0.06 , este resultado era el esperado, ya que se ha reportado que tanto el ajo como la cebolla tienen un efecto prebiótico y antioxidante (Kim *et al.*, 2010; Al-Sheraji *et al.*, 2013; Nurwantoro *et al.*, 2015). Sin embargo, en este caso la cebolla en polvo que se utilizó no poseía ningún carácter prebiótico, lo que podría deberse a que el método de obtención de este producto puede ser muy agresivo lo que hace que se pierda esta propiedad.

El romero (*Rosmarinus officinalis* L.) presentó un índice prebiótico de 1.03 ± 0.01 ; por lo que puede considerarse como una buena fuente prebiótica. Se ha reportado que tiene otras características, por ejemplo, puede inhibir *Shigella* sp. (Davidson *et al.*, 2013), y puede mejorar la estabilidad oxidativa en carne (Chinprahast *et al.*, 2012).

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es usada en algunas partes del mundo como infusión, puede tener muchos atributos benéficos como: antihipertensivo, antiinflamatorio, antioxidante y diurético (Da-Costa-Rocha *et al.*, 2014). Sin embargo, su índice prebiótico es menor a 1, por lo que no presenta esta propiedad.

El marinador universal presentó un índice prebiótico menor a 1 (0.51), lo que puede explicarse debido a que sus ingredientes principales son sal, azúcar, polifosfatos (E-452), potenciador de sabor (E-621), mezcla de antioxidantes (E-316 y E-331). La sal y el

fosfato aumentan la retención de agua, la cual es una característica deseada en la industria de alimentos. Actualmente, los consumidores están esperando marinadas sin conservadores y que tengan bajo contenido de sal, ya que esta ha sido relacionada con problemas de salud como la hipertensión (Sheard *et al.*, 2012). Algunos de los ingredientes utilizados en este estudio pueden tener funciones similares a los de los fosfatos y sales; por ejemplo, Jarvis *et al.* (2012) sustituyó los fosfatos con ciruelas pasas en una formulación de marinada de pollo con buenos resultados.

En cuanto a la fibra de maíz, esta exhibió un índice prebiótico de 1.75 ± 0.12 , lo cual concuerda con lo publicado por Buruiana *et al.* (2017), donde establecen que la fibra de maíz tienen efecto sobre el crecimiento de grupos bacterianos probióticos y sobre la producción de ácidos grasos de cadena corta. A este tipo de prebiótico se le ha atribuido efecto antioxidante e inmunomodulatorio (Singh *et al.*, 2005).

La fibra de nopal no se puede considerar como una buena fuente prebiótica debido a que su valor es de 0.50 ± 0.00 ; sin embargo, se ha reportado que el nopal (*Opuntia ficus indica*) contiene fibra dietética, flavonoides, carotenos, ácido ascórbico, fitoesteroles, colorofila y minerales y aporta beneficios principales como lo son la motilidad intestinal, prevención de constipación, regulación de glucosa, disminución de colesterol de baja densidad (Gallegos-Infante *et al.*, 2009; Pérez Méndez *et al.*, 2015; Jiménez-Aguilar *et al.*, 2015; Chamorro-Ramírez *et al.*, 2013).

Por otro lado, la inulina de achicoria presentó un IP de 1.79 ± 0.06 , actualmente, es el prebiótico más utilizado en la industria. Pompei *et al.* (2008), evaluaron el efecto prebiótico de inulina de alta solubilidad, al comparar los cambios en la microbiota y la producción de ácidos orgánicos volátiles durante la fermentación, encontrando que el uso de la inulina aumentaba el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos, así como la producción de ácido acético, láctico y fórmico en el medio de cultivo; por lo que podemos establecer que estos resultados están acordes con los resultados obtenidos en esta experimentación. Kuntz *et al.* (2013) hizo una revisión de los productos alimenticios que utilizaron inulina como ingrediente, encontró que las propiedades

tecnológicas que se les ha atribuido es como sustituto de grasa y de azúcar, además de que es un excelente retenedor de humedad.

Posteriormente, se desarrolló el cálculo del índice prebiótico en las formulaciones finales de la marinada (Tabla 19), basados en la proporción de ingredientes mostrado en la Tabla 7, las cuales se utilizaron como fuente de carbono. Se observó que todas las marinadas desarrolladas tienen un buen índice prebiótico. Los índices de la mezcla con fibra de inulina, nopal y maíz, mostraron un índice prebiótico de 1.20, 1.83 y 1.62 respectivamente. Por lo que todas las formulaciones de marinadas que tienen prebióticos pueden ser consideradas con carácter prebiótico.

Tabla 19. Índice prebiótico (IP) de ingredientes calculados de acuerdo a la ecuación modificada de Palfram *et al.*, 2003).

Marinadas	Índice prebiótico
Fibra de inulina (Mezcla 1)	1.62 ±0.02
Fibra de nopal (Mezcla 2)	1.21 ±0.08
Fibra de maíz (Mezcla 3)	1.83 ±0.00

6.5. Capacidad bacteriocida o bacteriostática de las bacterias ácido lácticas

La capacidad bacteriostática o bactericida se presenta en los sobrenadantes de fermentación de las BAL de estudio, donde se hace distinción de cada uno de los tratamientos a los que fueron sometidos y del efecto que tuvieron sobre la bacteria gram negativa (Fig. 30 a 33) y gram positiva (Fig. 34 a Fig. 37).

Con esta información se presenta un análisis y comparación del porcentaje de inhibición (Tabla 20 y 21) causado por cada uno de los compuestos producidos: ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y otros compuestos inhibidores.

6.5.1. Inhibición sobre crecimiento de *E. coli*.

Los cultivos bioprotectores de este estudio se evaluaron frente a una bacteria gram negativa (*E. coli*) que es indicador de contaminación fecal, como se muestra en las Figuras 30 a 33, donde se presentan cada uno de los resultados obtenidos del tratamiento

secuencial al que fueron sometidos los sobrenadantes de fermentación de las BAL de estudio sobre la inhibición de esta bacteria.

6.5.1.1. Inhibición de crecimiento de *E. coli* sobre los sobrenadantes de las bacterias lácticas sin tratamiento.

En la Figura 30 se muestra la inhibición de los sobrenadantes de las BAL de estudio sin tratamiento sobre *E. coli*. Se confirmó que todas las BAL de estudio presentaban efecto inhibitorio sobre esta, lo que es algo positivo ya que Yaakoubi *et al.* (2009) probaron 300 cepas de BAL y solo 42 de ellas mostraron actividad contra dos microorganismos, aunque esto pudo deberse al tratamiento al que se sometieron para cuantificar las bacteriocinas.

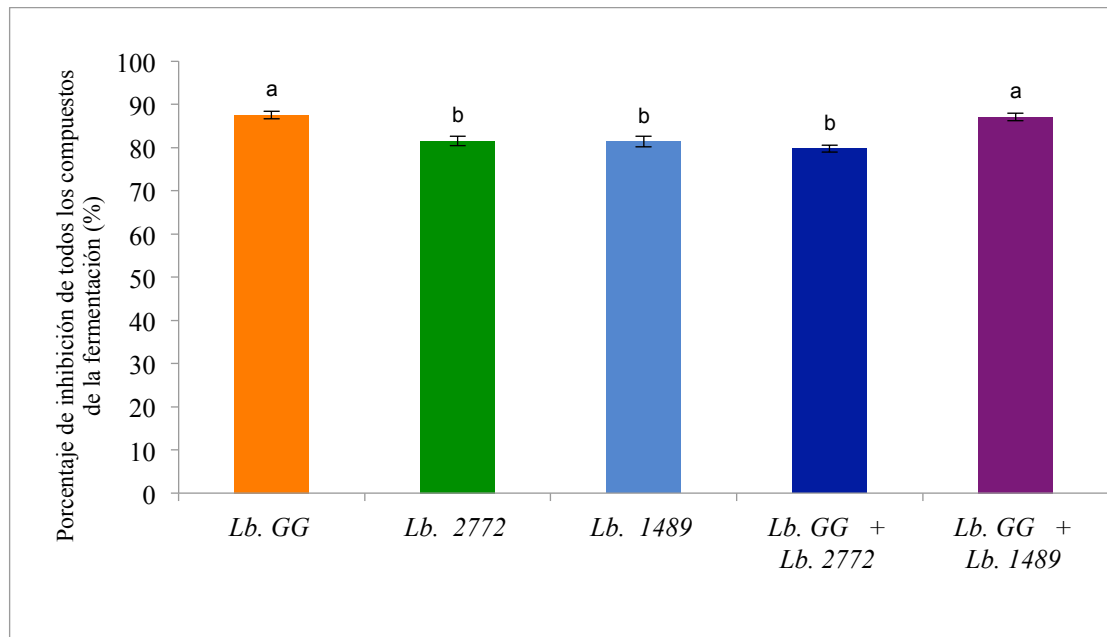


Figura 30. Inhibición de crecimiento de *E. coli* con los sobrenadantes de la fermentación de bacterias lácticas de estudio sin tratamiento.

Letras iguales significa que no existen diferencias significativas entre ellas al aplicar la prueba de ANOVA ($\alpha \leq 0.05$) (n=3).

La mayor inhibición se obtuvo en el sobrenadante de *Lb. GG* y al combinar esta bacteria con *Lb. 1489*, se presentó un porcentaje de inhibición de 87.52% y 87.08% respectivamente. Mientras que el producido por *Lb. 2772* y *Lb. 1489* es de aproximadamente 81%, valor similar al combinar la bacteria filante con la probiótica. Es importante recalcar que el porcentaje de inhibición es alto lo que representa una

alternativa ventajosa en caso de replicarse el desarrollo de estos compuestos antimicrobianos en el prototipo cárnico desarrollado. Estos valores se muestran en la Tabla 20.

6.5.1.2. *Inhibición de crecimiento de E. coli con los sobrenadantes neutralizados de la fermentación de las bacterias lácticas.*

En la Figura 31 se muestran los porcentajes de inhibición de los sobrenadantes neutralizados sobre *E. coli*, lo anterior se traduce, en que estos sobrenadantes tienen otros compuestos bacteriocidas o bacteriostáticos que no se refieren al ácido láctico; y para calcular la cantidad de este compuesto se deberá obtener por diferencia entre los distintos porcentajes de inhibición (Tabla 20).

Al analizar la inhibición de las bacterias de manera individual, el sobrenadante de *Lb.* 1489 mostró un porcentaje mayor de inhibición (18.98%), seguido por *Lb.* 2772 (15.34%) y *Lb.* GG (13.6%). Las bacterias combinadas tuvieron un valor mayor de inhibición (<50%) en este sobrenadante. Con estos resultados se revela que los patrones de producción de compuestos antimicrobianos por las BAL bajo las mismas condiciones es distinto al combinarlos, existe una sinergia para la producción de ácido.

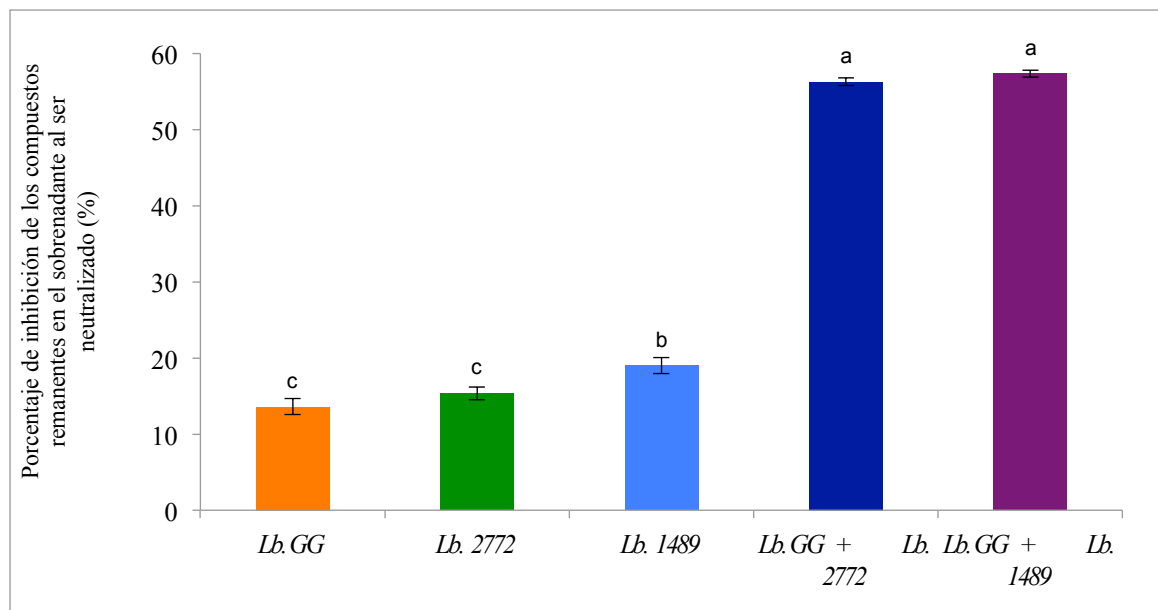


Figura 31. Inhibición de crecimiento de *E. coli* con los sobrenadantes neutralizados de la fermentación de bacterias lácticas de estudio.

Letras iguales significa que no existen diferencias significativas entre ellas al aplicar la prueba de ANOVA ($\alpha \leq 0.05$) (n=3).

6.5.1.3. Inhibición del crecimiento de *E. coli* con los sobrenadantes de la fermentación de las bacterias lácticas tratados con catalasa

En la Figura 32 se muestra el porcentaje de inhibición de crecimiento de *E. coli* con los sobrenadantes tratados con catalasa, es decir, cuando se elimina el peróxido de hidrógeno. Se observó que el sobrenadante de *Lb. 1489* presentó un porcentaje de inhibición en el sobrenadante de 13.7%, seguido de la cepa *Lb. 2772* (10.68%) y finalmente el de *Lb. GG* (8.68%). En una fermentación combinada se observó un patrón de mayor producción de peróxido de hidrógeno al compararlo con la fermentación individual, el valor de inhibición de las BAL de estudio es de 37.71% y de 27.90% en el tratamiento de bacteria probiótica + bacteria filante y bacteria probiótica + bacteria láctica respectivamente.

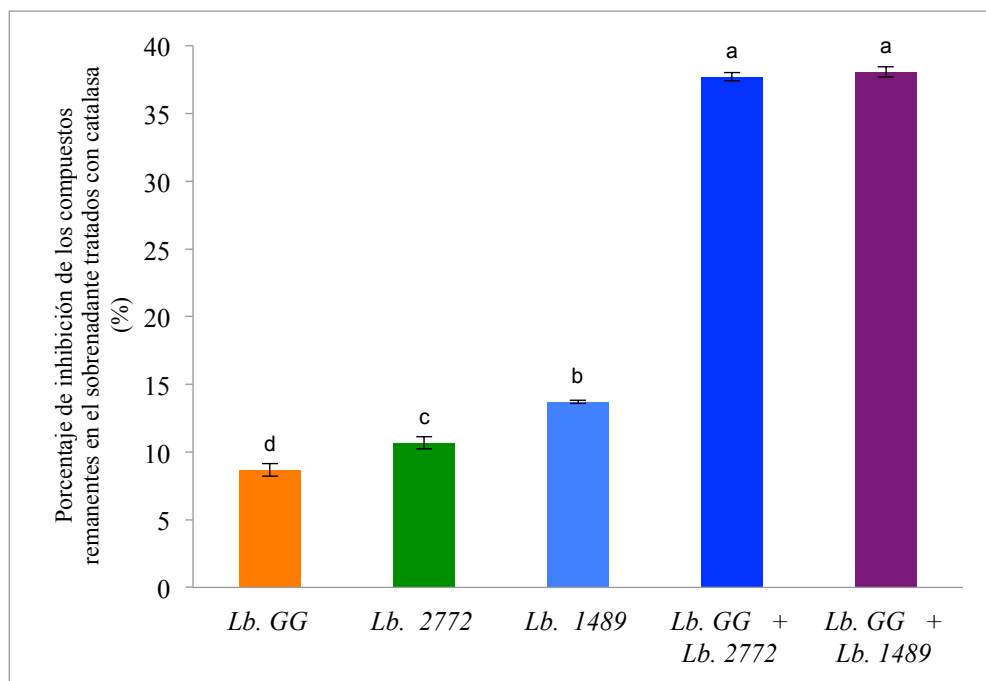


Figura 32. Inhibición de crecimiento de *E. coli* con los sobrenadantes tratados con catalasa de la fermentación de bacterias lácticas de estudio.

Letras iguales significa que no existen diferencias significativas entre ellas al aplicar la prueba de ANOVA ($\alpha \leq 0.05$) (n=3).

6.5.1.4. Inhibición de crecimiento de *E. coli* con los sobrenadantes de las bacterias lácticas tratados con proteinasa K

En la Figura 33 se muestra el porcentaje de inhibición del producto de fermentación contra *E. coli* al ser tratado con proteinasa K, lo que significa que se elimina los

compuestos del tipo bacteriocina. Se observó que el sobrenadante de *Lb.* 1489 presentó mayor inhibición (8.75%) seguido nuevamente por la cepa *Lb.* 2772 (5.9%) y la cepa probiótica (5.25%). Sin embargo, al igual que en el caso anterior, se observó una producción distinta de compuestos al combinar las bacterias, incrementándose el porcentaje de inhibición en los componentes remanentes en el sobrenadante de 25.86% y 27.90% para el tratamiento de bacteria probiótica + filante y bacteria probiótica + láctica respectivamente.

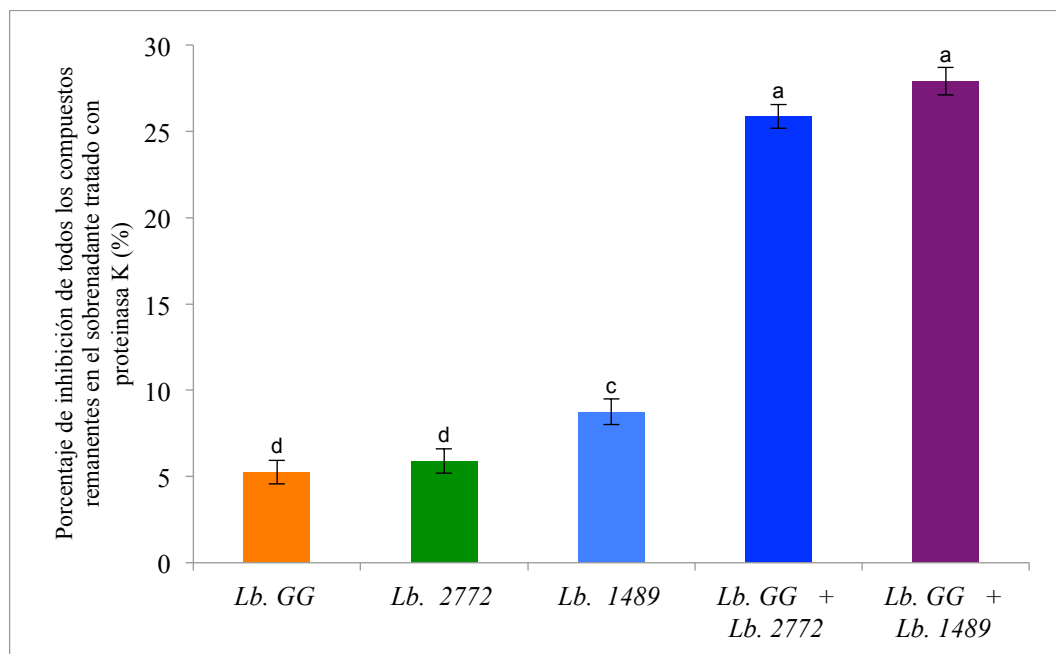


Figura 33. Inhibición de crecimiento de *E. coli* con los sobrenadantes tratados con proteinasa K de la fermentación de bacterias lácticas de estudio
 Letras iguales significa que no existen diferencias significativas entre ellas al aplicar la prueba de ANOVA ($\alpha \leq 0.05$) (n=3).

6.5.2. Inhibición sobre crecimiento de *Listeria innocua* ATCC 33090

Se evaluó la inhibición sobre el crecimiento de *Listeria innocua*, que es una bacteria indicadora gram (+), de la presencia de *Listeria monocytogenes* que es una de las bacterias que más ha causado muertes en productos listos para comer y por lo cual se toma como referencia para este estudio (Thévenot *et al.*, 2006). En las Figuras 34 a 37, se presentan cada uno de los resultados obtenidos del tratamiento secuencial al que fueron sometidos los sobrenadantes de fermentación de las BAL de estudio para estas bacterias.

6.5.2.1. Inhibición de crecimiento de *L. innocua* sobre los sobrenadantes sin tratamiento de la fermentación de bacterias ácido lácticas.

En la Figura 34 se muestra el porcentaje de inhibición de crecimiento de *L. innocua* en los sobrenadantes de las BAL de estudio sin tratamiento. Se observó que el sobrenadante de *Lb. GG* presentó un porcentaje de inhibición sobre *L. innocua* de 84.93%, seguido de *Lb. 1489* (79.71%) y de *Lb. 2772* (76.99%). Al combinar las bacterias se observó un porcentaje de inhibición en el sobrenadante de 79.22% y 86.27% para la bacteria probiótica con la filante y la bacteria probiótica con la láctica respectivamente.

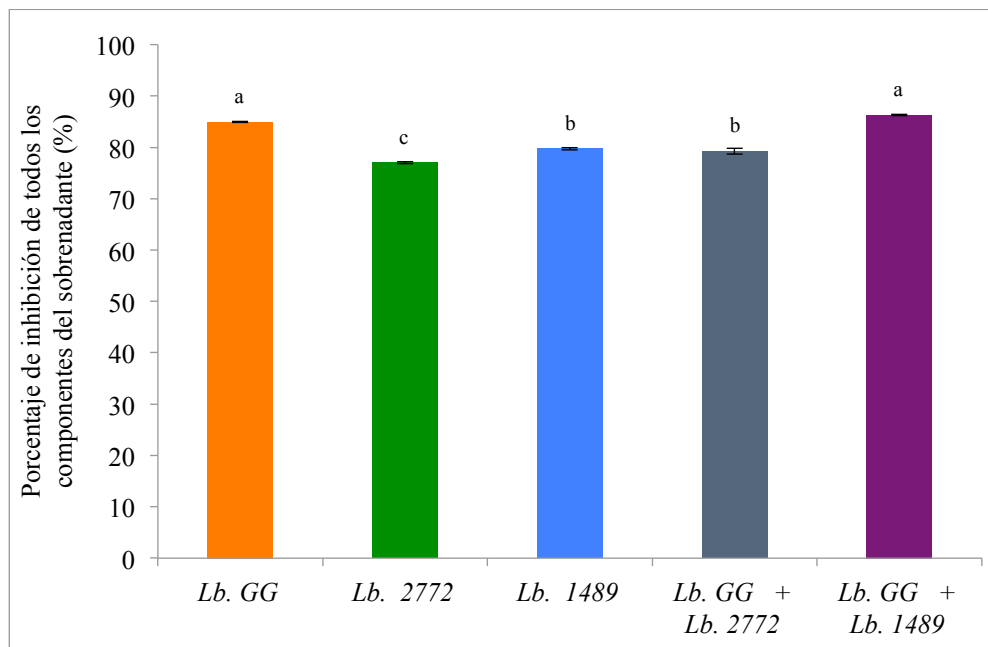


Figura 34. Inhibición de crecimiento de *L. innocua* en los sobrenadantes de la fermentación sin tratamiento de bacterias lácticas de estudio
Letras iguales significa que no existen diferencias significativas entre ellas al aplicar la prueba de ANOVA ($\alpha \leq 0.05$) (n=3).

El espectro de porcentaje de inhibición total contra bacterias del tipo *L. innocua* (gram +) es distinto al presentado por las mismas bacterias contra *E. coli* (Tabla 20 y 21), lo que indica que los mecanismos bacteriostáticos o bacteriocidas son distintos entre bacterias.

6.5.2.2. Inhibición de crecimiento de *L. innocua* con los sobrenadantes neutralizados de la fermentación de las bacterias lácticas.

En la Figura 35, se muestran los valores de porcentaje del crecimiento de *L. innocua* sobre los sobrenadantes neutralizados, encontrándose que todos los tratamientos son distintos entre sí ($\alpha \leq 0.05$). Esto significa que el porcentaje de inhibición se relaciona con compuestos antimicrobianos distintos al producido por ácidos orgánicos. Se observó que el sobrenadante de *Lb.* 1489 tiene un porcentaje de inhibición de 15.08%, el de *Lb.* 2772 de 12.77% y el de *Lb.* GG menor inhibición con 8.67%. Al combinar la bacteria probiótica con la bacteria filante se observó un porcentaje de inhibición del 26.23%; y de 35.71% en el caso de la fermentación de la bacteria probiótica con la láctica.

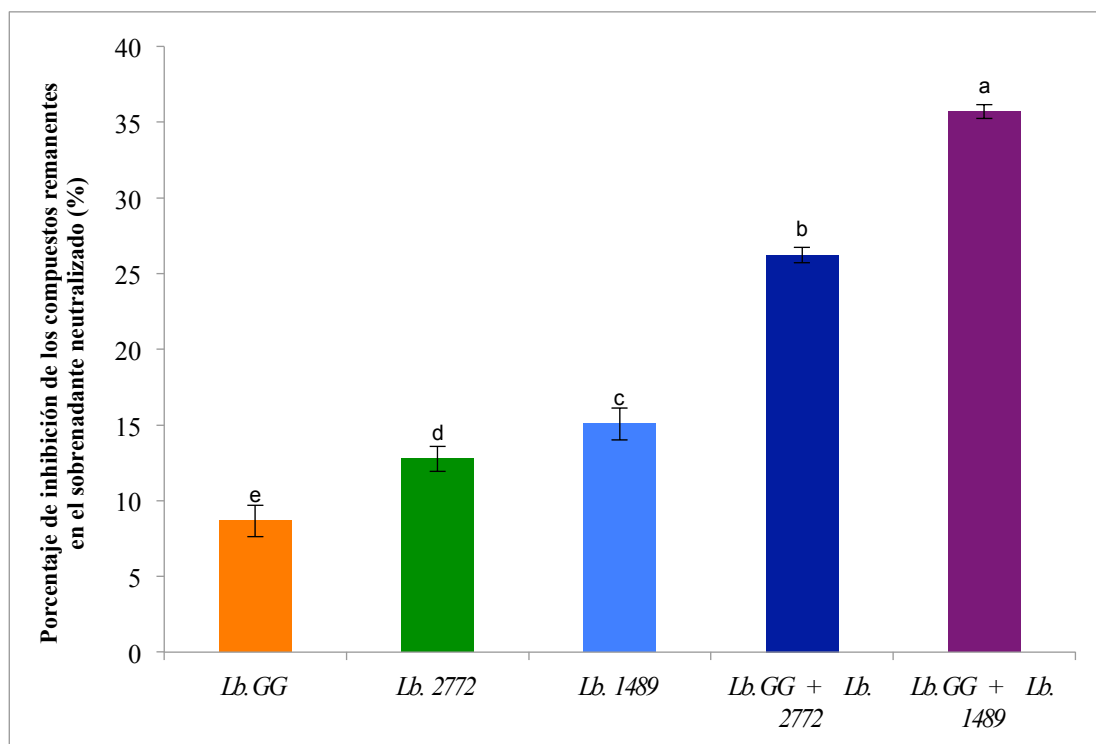


Figura 35. Inhibición de crecimiento de *L. innocua* en los sobrenadantes neutralizados de la fermentación de bacterias lácticas de estudio.

Letras iguales significa que no existen diferencias significativas entre ellas al aplicar la prueba de ANOVA ($\alpha \leq 0.05$) (n=3).

6.5.2.3. Inhibición del crecimiento de *L. innocua* con los sobrenadantes de la fermentación de las bacterias lácticas tratados con catalasa.

En la Figura 36 se muestran los valores del porcentaje de inhibición del sobrenadante tratado con catalasa sobre el crecimiento de *L. innocua*, lo que se refiere a los componentes remanentes después de haber neutralizado tanto el ácido láctico, como el

peróxido de hidrógeno. Se observó que el sobrenadante de la cepa *Lb. 2772* y *Lb. 1489*, presentaron un porcentaje de inhibición de 8.79% y 8.55%, observándose una diferencia con relación al sobrenadante de la cepa probiótica de 5.55%. Al observar el efecto combinado sobre el porcentaje de inhibición de *L. innocua* se puede apreciar que los valores son de 10.30% y de 11.02% para el producto de fermentación de la bacteria probiótica con la bacteria filante y el obtenido por la bacteria probiótica con la bacteria láctica.

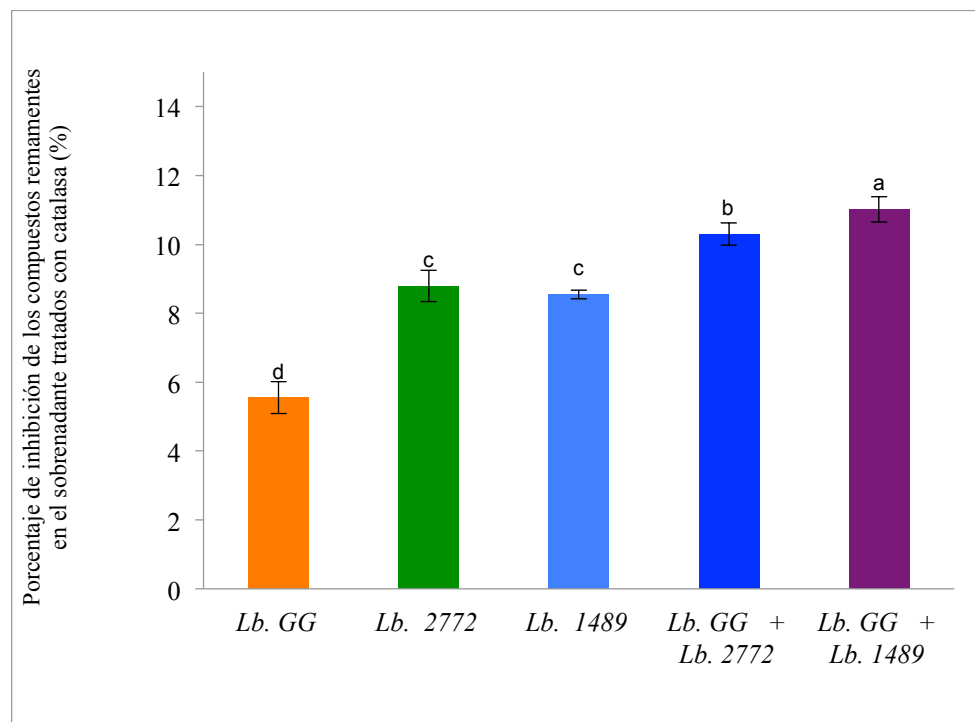


Figura 36. Inhibición de crecimiento de *L. innocua* con los sobrenadantes tratados con catalasa de la fermentación de bacterias lácticas de estudio.

Letras iguales significa que no existen diferencias significativas entre ellas al aplicar la prueba de ANOVA ($\alpha \leq 0.05$) (n=3).

6.5.2.4. Inhibición de crecimiento de *L. innocua* con los sobrenadantes de la fermentación de las bacterias lácticas tratados con proteinasa K.

En la Fig. 37 se muestran los porcentajes de inhibición del crecimiento sobre *L. innocua* por los sobrenadantes tratados con la proteinasa K, es decir cuando se han eliminado los compuestos del tipo bacteriocina. Se observó que el sobrenadante de *Lb. 1489* presentó un porcentaje de inhibición de 5.68%, el de la cepa *Lb. 2772* de 4.98% y el de la cepa probiótica de 3.1%. Se observó una diferencia significativa en relación con la combinación de cepas.

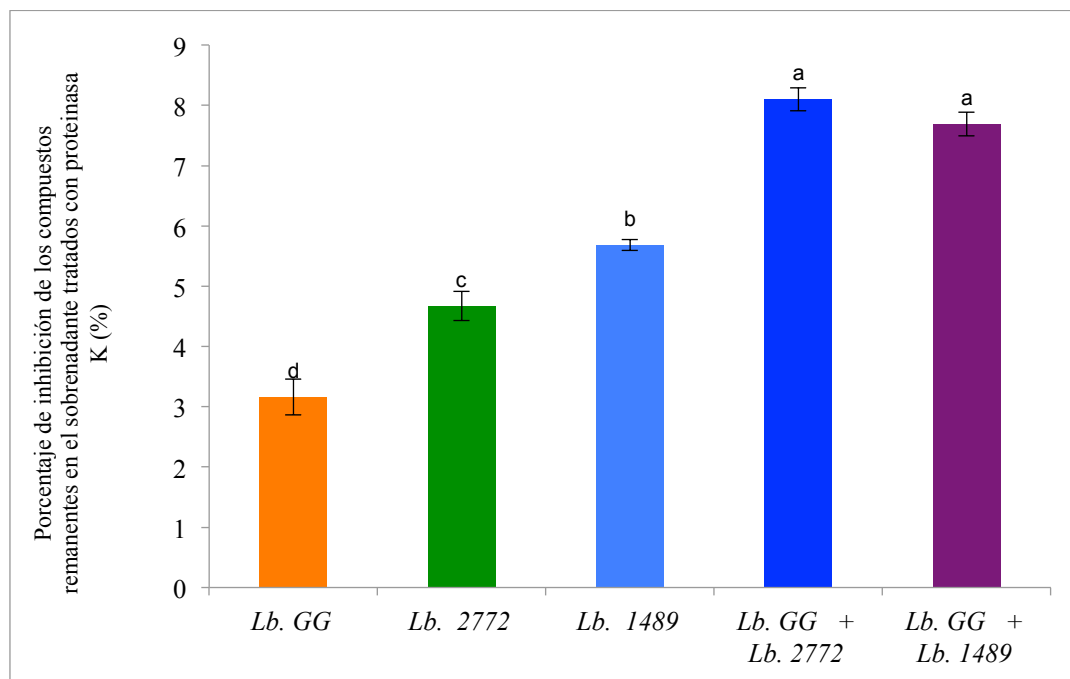


Figura 37. Inhibición de crecimiento de *L. innocua* con los sobrenadantes tratados con proteinasa K de la fermentación de bacterias lácticas de estudio.

Letras iguales significa que no existen diferencias significativas entre ellas al aplicar la prueba de ANOVA ($\alpha \leq 0.05$), $n=3$.

Se ha explicado, en esta sección, las diferencias que existen en cada uno de los productos de fermentación de las BAL de estudio indicando el porcentaje de inhibición en los sobrenadantes de estudio para *E. coli* y *L. innocua*. Con esta parte experimental, se comprobó que las BAL de estudio son capaces de producir distintos compuestos antimicrobianos como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, entre otros; capaces de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas Gram- positivas y Gram- negativas, como se muestra en la Tabla 20 y 21. Es importante recalcar que cada una de las BAL de estudio tiene una producción distinta de los compuestos antimicrobianos, lo cual concuerda con lo reportado por Kolożyn-Krajewska y Dolatowski (2012). La actividad antimicrobiana atribuida a las BAL puede tener un efecto sinérgico dado por todas y cada una de las sustancias producidas; lo que significa que cada tipo de compuesto producido por las BAL es equivalente a añadir una barrera para controlar el desarrollo microbiano causante de deterioro en el alimento (Wang y Wang, 2014).

Se puede observar que existe producción de ácido láctico por las BAL (Tabla 20 y 21), lo que se refleja en un efecto antimicrobiano tanto para las bacterias gram (+) como

gram (-) de este estudio. El principio de esta inhibición se basa en que el ácido láctico puede acidificar el citoplasma de las células lo cual tiene efecto sobre la cantidad de energía disponible de tal manera que afectan las funciones metabólicas básicas (Suskovic *et al.*, 2010; Reis *et al.*, 2012). En la Tabla 20 y 21 puede observarse que la inhibición de ácidos orgánicos es mayor a 60% tanto para *E. coli* como para *L. innocua* cuando las BAL son fermentadas de manera individual, este porcentaje se reduce al combinarlas. En particular, cuando se observó que la inhibición de *E. coli* por este compuesto es de máximo 30% al evaluar el efecto de cepas combinadas, mientras que para *L. innocua* la inhibición máxima es de 53%.

El peróxido de hidrógeno tiene un gran efecto oxidativo sobre la células bacterianas que da como resultado una destrucción de estructuras moleculares básicas de las proteínas de las células patógenas, no pueden afectar a las BAL ya que estas no tienen el sistema lactoperoxidasa (Suskovic *et al.*, 2010). En las Tablas 20 y 21 puede observarse que las BAL de estudio producen este compuesto y que tiene efecto inhibitorio contra *E. coli* y *L. innocua*. En particular se ha reportado que el peróxido de hidrógeno tiene un efecto sobre las bacterias patógenas psicrotófas (Reis *et al.*, 2012). La desventaja de este compuesto es que puede interferir con las propiedades sensoriales de los productos cárnicos debido a que puede incrementar la rancidez y decoloración de los productos finales (Reis *et al.*, 2012). Se observó en las Tablas 20 y 21 que la inhibición de peróxido de hidrógeno por la fermentación de BAL individuales es máximo 7% tanto para *E. coli* como para *L. innocua*. Este porcentaje se triplicó al combinar las BAL en la fermentación para *E. coli* y *L. innocua*.

Las bacteriocinas son compuestos péptidos producidos ribosomalmente y que tienen actividad antimicrobiana contra bacterias Gram (+) y Gram (-), la ventaja de que se produzcan *in situ* en productos fermentados es que pueden ser compuestos biopreservadores naturales. En particular se ha reportado que estas sustancias pueden actuar sobre *L. monocytogenes* (Suskovic *et al.*, 2010), en este estudio se observó que las bacteriocinas tienen efecto inhibitorio sobre *L. innocua* (Tabla 21). El modo de acción se basa principalmente en que las bacteriocinas interaccionan con lípidos que se encuentran en las membranas, dando como resultado la formación de poros que desestabilizan a la

célula. Lo interesante es que las BAL productoras de bacteriocinas son capaces de desarrollar un mecanismo de protección contra estos compuestos (Suskovic *et al.*, 2010). Por otro lado, está reportado que algunas ventajas de estos compuestos en productos alimenticios es que proveen protección extra durante condiciones de abuso de temperaturas, reducen el uso de conservadores, permiten el uso de un tratamiento térmico menos severo, mejoran conservación de vitaminas y nutrientes, mejoran las características sensoriales, permiten la venta de productos con menor acidez, menor contenido de sal y mayor contenido de agua (Reis *et al.*, 2012). Se observó que el porcentaje de inhibición por bacteriocinas es de máximo 5% en BAL fermentadas de manera individual, mientras que al combinarlas se observó que la inhibición para *E. coli* es el doble.

En la Tabla 20, se presenta el porcentaje de inhibición por *E. coli* producido por las BAL de estudio, observándose inhibición por parte de todas ellas contra este microorganismo. La importancia que tienen estos resultados en la industria de alimentos en particular en la cárnica, es que *E. coli* es considerado un problema de salud pública, sobre todo en productos que se desarrollan bajo condiciones de abuso de temperatura (Aymerich y Hugas, 1998; Quintero Salazar, 2001); por lo que la inclusión de las BAL de estudio puede ser efectiva para contrarrestar este tipo de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS). El porcentaje de inhibición obtenido por los compuestos producidos por estas BAL es superior al 80% en su totalidad, es decir cuando todos los compuestos antimicrobianos están presentes.

Tabla 20. Porcentaje de inhibición de *E. coli* por compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias ácido lácticas de estudio.

Tipo de inhibición	Bacterias ácido lácticas (BAL) de estudio				
	<i>Lb. GG</i> (probiótica)	<i>Lb.</i> 2772 (filante)	<i>Lb.</i> 1489 (láctica)	<i>Lb.</i> (probiótica)+ <i>Lb. 2772</i> (filante)	<i>Lb. GG</i> (probiótica) + <i>Lb. 1489</i> (láctica)
Todos los compuestos antimicrobianos	87.52	81.51	81.31	79.78	87.08
Ácidos orgánicos	73.92	66.17	62.4	23.53	29.74
Peróxido de hidrógeno	4.92	4.66	5.28	18.54	19.27
Bacteriocinas	3.43	4.78	4.95	11.85	10.17
Otros compuestos inhibidores	1.82	1.12	3.80	14.01	17.73

En la Tabla 21 puede observarse la inhibición de *L. innocua* por los compuestos antimicrobianos producidos por las BAL de estudio, observándose que todas estas produjeron compuestos antimicrobianos capaces de inhibir el desarrollo de *L. innocua* en un 75%. *L. innocua* ha sido encontrada en productos cárnicos de cerdo procesados y en productos listos para comer causando enfermedades; además este microorganismo tiende a desarrollarse a bajas temperaturas, ser termotolerante y crecer en un rango de pH de 4.6 a 9.6 por lo que se considera un bacteria de peligro en este tipo de alimentos (Thévenot *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2005).

Tabla 21. Porcentaje de inhibición de *L. innocua* por compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias ácido lácticas de estudio.

Tipo de inhibición	Bacterias ácido lácticas (BAL) de estudio				
	<i>Lb. GG</i> (probiótica)	<i>Lb.</i> 2772 (filante)	<i>Lb.</i> 1489 (láctica)	<i>Lb. GG</i> (probiótica)+ <i>Lb.</i> 2772 (filante)	<i>Lb. GG</i> (probiótica)+ <i>Lb.</i> 1489 (láctica)
Todos los compuestos antimicrobianos	84.93	76.99	79.71	79.22	86.26
Ácidos orgánicos	76.26	64.22	64.63	53.00	50.56
Peróxido de hidrógeno	3.12	3.98	6.53	15.92	24.68
Bacteriocinas	2.39	3.81	2.87	2.21	3.33
Otros compuestos inhibidores	0.77	1.17	2.81	5.88	4.36

Las BAL de estudio pueden producir diversos compuestos antimicrobianos que pueden tener efecto contra microorganismos patógenos, debido a que se pueden producir compuestos como: ácido láctico, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Wang y Wang, 2014). Las BAL son generalmente reconocidas como seguras (GRAS) por lo que pueden incluirse en alimentos (Aymerich y Hugas, 1998). Lo anterior hace suponer que las bacterias de estudio pueden ser utilizadas como cultivos bioprotectores que confieren bioconservación, entendiéndose por este término, a la combinación del proceso de fermentación y preservación que da como resultado un aumento en la vida de anaquel principalmente al mejorar la seguridad alimentaria debido a la inclusión de microorganismos benéficos (principalmente bacterias ácido lácticas) y los compuestos producidos por estas (Kröckel, 2013).

Lo encontrado hace suponer que las BAL de estudio pudieran ser utilizadas en el prototipo listo para comer con buenos resultados. El comportamiento de producción de compuestos antimicrobianos pudiera replicarse en el prototipo cárnico de estudio; por lo que es importante seleccionar BAL que puedan producir distintos compuestos antimicrobianos para dar un amplio espectro de inhibición. Lo anterior, hace suponer que se podría incorporar la bacteria *Lb. GG* (probiótica), *Lb. 2772* (filante) y la combinación de ambas como la alternativa de uso.

Lb. GG, esta considerada como una cepa probiótica; por lo que su inclusión podría dar como resultado, una formulación cárnica lista para comer con inulina de achicoria que es un prebiótico, dando así un simbiótico. El uso de bacterias probióticas en productos cárnicos marinados de cerdo podría ser viable, hasta este momento estas bacterias se han utilizado en productos fermentados cárnicos del tipo no marinado (Rubio *et al.*, 2013). Por ejemplo, se utilizó la cepa probiótica de *Lb. rhamnosus* CTC 1679 para fermentar salchichas, comprobándose que estas podían sobrevivir en el tracto gastrointestinal (Rubio *et al.* 2014).

Ahora bien, la bacteria filante, podría ofrecer la característica de protección por la producción de su exopolisacárido, lo cual ha sido reportado como una de sus propiedades, ya que se ha demostrado que es una defensa contra el estrés como el ataque por fagos, los iones tóxicos metálicos y la desecación. Las bacterias filantes producen un exopolisacárido, se ha especulado que pudiera ser utilizado como prebiótico para otras BAL (Harutoshi, 2013).

Lo anterior hace suponer que la combinación de ambas cepas pudiera tener un efecto protocooperativo. Por ello, se seleccionaron estas cepas como cultivos bioprotectores en el prototipo cárnico funcional listo para comer elaborado con inulina de achicoria como prebiótico.

6.6. Efecto de la inclusión de las bacterias ácido lácticas en el producto cárnico marinado.

6.6.1. Análisis de color

Se analizó el color en términos del sistema CIEL (Braña Varela *et al.*, 2011) y se comparó el cambio de este parámetro contra el control. Se observó (Fig. 38) que al agregar cultivos bioprotectores al prototipo se desarrollaron diferencias en este parámetro con respecto al control, lo que está en concordancia con lo establecido por Quintero Salazar (2001), la cual inoculó BAL en pollo obteniendo los mismos resultados. Las diferencias de color contra el control son mayores, conforme aumenta el tiempo, al añadir BAL (Fig. 38). El tratamiento que presenta menores cambios de color con relación al control es el elaborado con *Lb. 2772*, seguido por *Lb. GG*, encontrando el mayor cambio cuando se combinaron ambas bacterias.

Esto hace suponer que se requieren de estrategias para que no se desarrollen diferencias en este parámetro; por lo que se pueden implementar técnicas como la liofilización de las BAL a fin de incorporarlas de otra manera que cause menor impacto sobre esta variable, tomando en cuenta que este factor es esencial para una decisión de compra por parte del consumidor (Braña Varela *et al.*, 2011).

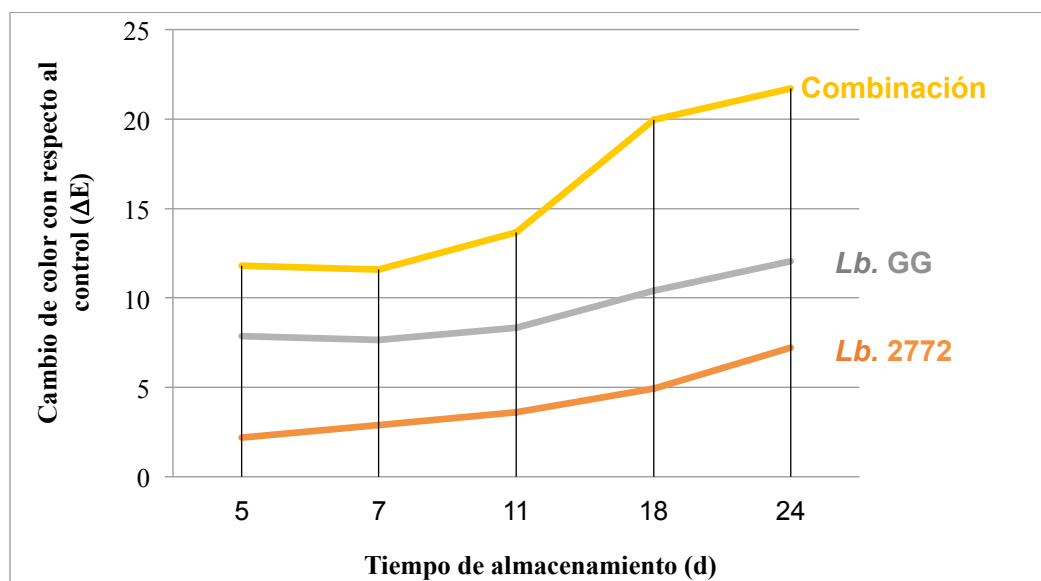


Figura 38. Cambio de color (ΔE) de prototipos almacenados a 6 °C .

6.6.2. Oxidación de proteínas y lípidos

En la Figura 39 se muestra un análisis de componentes principales, el cual explica la variabilidad de los resultados entre la oxidación de lípidos y proteínas, se agruparon en 3 clúster los resultados. Los que están hacia el vector de malonaldehido (MDA) (A) son aquellos tratamientos que son mayormente explicados por la oxidación de lípidos, en este segmento podemos observar principalmente a los prototipos que se desarrollaron con la inclusión de la bacteria filante (*Lb. 2772*) y las bacterias combinadas (*Lb. 2772* y *Lb. GG*).

Los tratamientos que se encuentran en el bloque A son aquellos que no presentaron una oxidación significativa y que son estadísticamente diferentes a los dos grupos anteriores, lo que se puede decir es que los tratamientos combinados disminuyen los procesos de oxidación; en particular esto hace suponer que la bacteria filante tiene la característica de servir como protectora de oxidación para la bacteria probiótica. Esto puede deberse a las interacciones que la bacteria filante forma con la matriz proteica del sistema como ha sido explicado previamente por Hess *et al.* (1997).

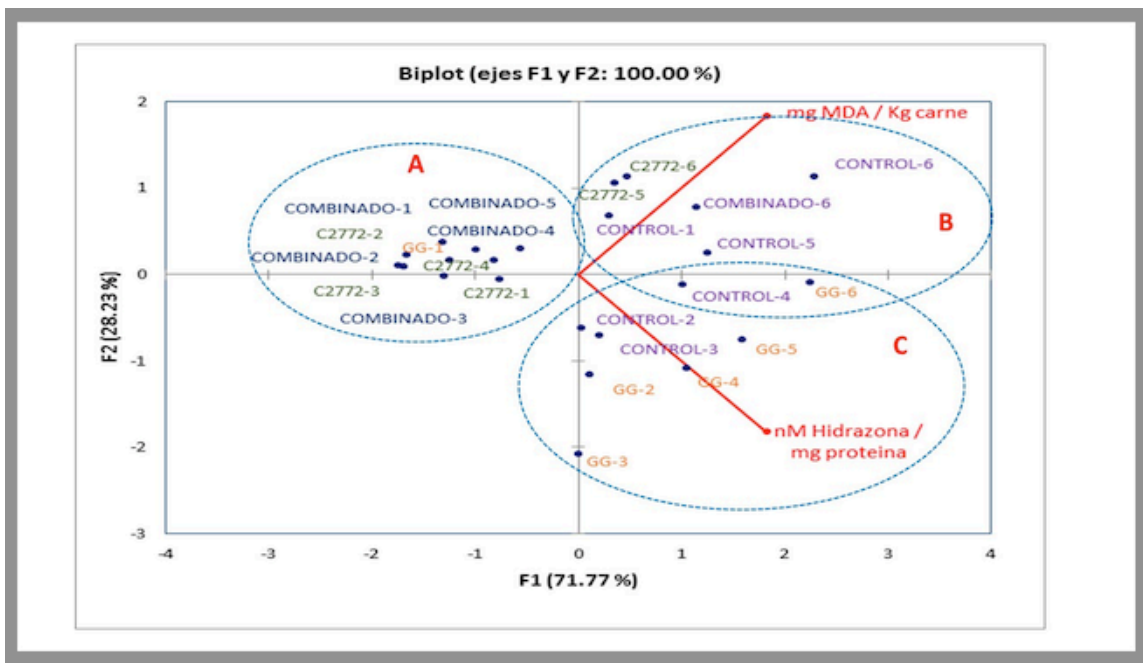


Figura 39. Análisis de componentes principales donde se explica la oxidación de lípidos y proteínas en el prototipo almacenado a 6 °C durante 24 d.

La oxidación de lípidos principalmente se da cuando los ácidos grasos poliinsaturados esterificados con los fosfolípidos producen radicales alquilo, debido a que pierden un hidrógeno lábil adyacente al doble enlace por factores como la luz, iones metálicos o calor. Los aldehídos son los compuestos volátiles más importantes que se producen durante este tipo de oxidación. Estas reacciones se llevan a cabo lentamente hasta alcanzar un mecanismo acelerado debido a un incremento crítico de los radicales libres (Venegas y Pérez, 2009). Por lo cual, se han utilizado compuestos antioxidantes para disminuir esta oxidación.

La inclusión de BAL puede tener un efecto positivo o negativo en la oxidación de lípidos, por un lado la puede favorecer por producción de peróxido de hidrógeno y por lo tanto afectar el color y las propiedades de rancidez y de decoloración del producto. Lo anterior debido a que el peróxido de hidrógeno puede reaccionar con la mioglobina (Fe^{2+}) dando como resultado ferril mioglobina (Fe^{4+}) que actúa como oxidante de los lípidos (Kolozyn-Krajewska y Dolatowski, 2012). Por otro lado, se ha reportado que el género y la especie de BAL que se utilice tiene efecto protector sobre esta oxidación, ya que existen bacterias del género *Lactobacilli* y *Staphylococci* que pueden inhibir la oxidación de ácidos grasos insaturados, que se refleja en un cambio en el color café oscuro de la carne a rojo brillante (Fe^{3+} a Fe^{2+}), aunque todavía no se ha establecido el mecanismo por el cual sucede esta reacción (Kolozyn-Krajewska y Dolatowski, 2012).

El efecto de las bacterias productoras de exopolisacárido todavía no ha sido establecido, sin embargo, la hipótesis de este trabajo es que esta goma producida por las BAL pudiera servir para proteger la oxidación que se lleva a cabo en el medio cárnico.

El bloque C se explica en base a la oxidación de proteínas, donde se encuentran los tratamientos desarrollados con bacterias filantes en las últimas etapas de su almacenamiento, lo que indica que con este tratamiento, primero se llevó a cabo una oxidación de lípidos, seguida por la de proteínas. En este clúster se encuentran los tratamientos control. Generalmente, la oxidación de proteínas esta dada por las especies reactivas al oxígeno (ROS) que afectan las proteínas miofibrilares de la carne, dando lugar a tres tipos de compuestos: (1) unión y (2) fragmentación de proteínas y (3) la

modificación de las cadenas terminales de las mismas, obteniendo: hidroperóxidos, carbonilos, sulfonas. Para evitar este tipo de reacciones en productos cárnicos procesados, se han utilizado aceites esenciales, hierbas, frutas y otros materiales. En años recientes se ha utilizado el efecto de compuestos fenólicos como estrategia antioxidante (Lund *et al.*, 2011). Es interesante resaltar que en este estudio se utilizaron compuestos antioxidantes como el chipotle (Ornelas-Paz *et al.*, 2010; Moreno-Escamilla *et al.*, 2015), ajo (Kim *et al.*, 2010; Al-Sheraji *et al.*, 2013; Nurwantoro *et al.*, 2015), romero (Chinprahast *et al.*, 2012) y jamaica (Da-Costa-Rocha *et al.*, 2014). Otros estudios se han centrado en el uso de fibras con efecto antioxidante, como la fibra de la uva y la fibra de arroz, que presentaron un efecto contra la oxidación de los lípidos (Decker y Park, 2010).

Los que están entre los segmentos B y C, presentaron los dos tipos de oxidaciones, donde se ubicaron los prototipos que incluyen a la bacteria *Lb. GG* cuando está desarrollada de manera individual; además de encontrar en este clúster al control.

Estos resultados están relacionado con lo encontrado previamente en las Tablas 20 y 21, ya que las bacterias al ser combinadas producen menos ácidos orgánicos, lo que podría tener incidencia en los procesos de oxidación.

6.6.3. Análisis de perfil de textura

El conocimiento de las propiedades de textura puede hacerse mediante pruebas de Análisis de Perfil de Textura (TPA), donde se simula dos mordidas del consumidor al aplicarse dos compresiones, y con la que pueden obtenerse diferentes variables respuestas como: fracturabilidad, dureza, cohesividad, elasticidad, adhesividad y gomosidad (Domínguez *et al.*, 2001). La Figura 40 muestra una Gráfica de Telaraña, donde se presenta el perfil de textura después de someter al prototipo a 24 d de almacenamiento a 6°C, y a continuación se describen cada uno de los atributos de estudio.

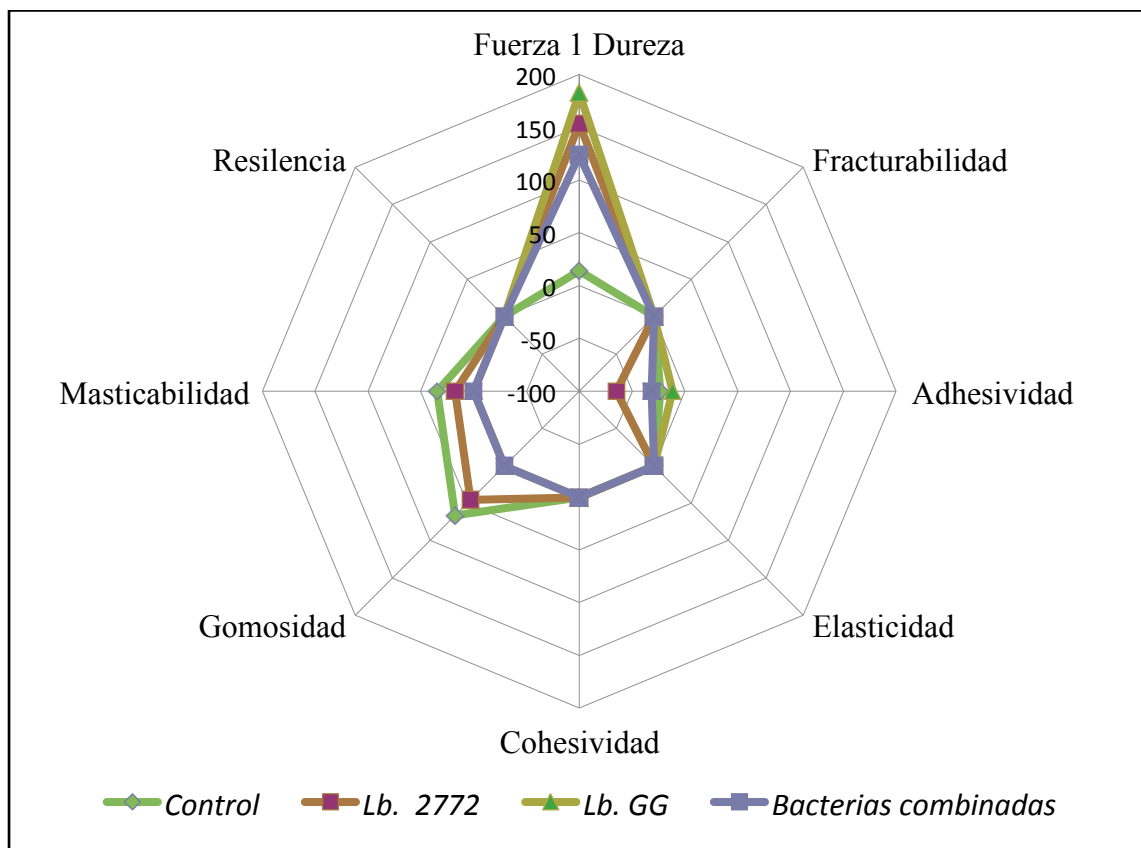


Figura 40. Análisis de Perfil de Textura (TPA) representado en una gráfica de telaraña de los prototipos desarrollados con las BAL después de 24 d de fermentación.

1. Fracturabilidad: Esta definida como la fuerza bajo la cual un material se fractura o desmorona (Szczesniak *et al.*, 1963; Hleap y Velasco, 2010). Al elaborar el producto cárnico marinado listo para comer, la fracturabilidad es de 0.8 aproximadamente para cada uno de los prototipos, la cual no sufre cambios con respecto al tiempo de almacenamiento en ninguno de los tratamientos analizados.
2. Dureza: Se conoce como la fuerza necesaria para obtener determinada deformación, y se refiere a la fuerza requerida para comprimir la carne entre los dientes o entre la lengua y el paladar, representa la primera mordida que podría dar el comensal (Szczesniak *et al.*, 1963; Hleap y Velasco, 2010). Al principio del almacenamiento, el producto control presentó una fuerza de (316.91 ± 43.49) , sin embargo, como puede apreciarse en la Figura 40 después de 24 d de almacenamiento este valor decrece hasta un 90%, lo que implica que pudiera existir una ruptura estructural de tejidos de la carne, posiblemente debido a que

la marinada y sus componentes se alteran durante el almacenamiento, además de que puede ser indicativo de deterioro en la carne. Sin embargo, es importante mencionar que el control tenía una dureza de 13.9 N al final del almacenamiento, que es menor al compararla con los prototipos inoculados con BAL (Lb. 2772= 153 N; Lb. GG = 182.52 N y la combinación de ambas = 123.7 N).

3. Cohesividad. Esta definida como la fuerza de las uniones internas que conforman un producto y describen la extensión a la cual puede deformarse antes de romperse (Szczesniak *et al.*, 1963). Los valores al inicio del experimento (0.46-0.51) son similares después de 24 d para todos los tratamientos analizados (0.42-0.52).
4. Elasticidad. Esta definida como la capacidad que tiene un material para recuperar su condición original; por lo que puede medir que tanto se ha roto de la estructura original (Szczesniak *et al.*, 1963; Hleap y Velasco, 2010), se encontró que los valores son similares en cada uno de los tratamientos analizados.
5. Adhesividad. Se define como la capacidad de hacer hebra. Al final del almacenamiento se observaron valores de -64.89 g.sec en las bacterias reportadas como filantes (Lb. 2772), lo que significa que un valor negativo es un material pegajoso o adhesivo (Hleap y Velasco, 2010). Esto podría ser considerado como una ventaja ya que pudiera prevenir la sinéresis en este tipo de productos cárnicos con relación al tiempo de almacenamiento. Los prototipos con la combinación de ambas bacterias presentan la mitad de este valor (-31.6 g.sec). Algo que es interesante es que el control tiene un componente adhesivo-filante de -23.31 g.sec; posiblemente debido a la presencia de otros microorganismos que forman biopelículas, como por ejemplo de *Pseudomonas* u otras bacterias lácticas causante de deterioro en carne de cerdo como *Lb. algidus* (Schirmer *et al.*, 2009; Bruckner *et al.*, 2013).
6. Gomosidad: Es un parámetro que se calcula multiplicando la dureza, la cohesividad y la elasticidad; podría ser considerado como la energía usada para romper un alimento semisólido a fin de que sea adecuado para ser tragado (García-Segovia, 2014; Hleap y Velasco, 2010). El producto control exhibe un

valor de 66.2; seguido por el *Lb. 2772*, 45.44; y finalmente por *Lb. GG* y las bacterias combinadas, 0.03 y 0.028, respectivamente.

6.6.4. Análisis Sensorial

En cuanto a las pruebas sensoriales, se procedió a realizar pruebas triangulares de color y olor (Tabla 22 y 23), se observó que las BAL de estudio ocasionan un cambio en este parámetro. Esto no significa que el producto se encuentre en buenas o malas condiciones, únicamente que el producto cárnico es distinto en este atributo con relación al control. La comparación se llevó a cabo con un producto cárnico recién elaborado sin BAL, las cuales fueron comparadas con los prototipos en almacenamiento.

Como se observa en la Tabla 22, desde el inicio del almacenamiento se detectaron diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$) entre tratamientos tanto al utilizar la bacteria probiótica como con la combinación de ambas cepas.

Tabla 22. Pruebas triangulares de olor con relación al tiempo en pruebas almacenadas a 6°C durante 24 d.

Tiempo de almacenamiento (d)	PRUEBAS ANALIZADAS							
	Control bajo condiciones de almacenamiento		Prototipo elaborado con <i>Lb 2772</i>		Prototipo elaborado con <i>Lb. GG</i>		Prototipo elaborado con <i>Lb GG y Lb. 2772</i>	
5	5		6	√	6	√	5	
7	4		7	√	6	√	6	√
11	4		5		6	√	7	√
18	3		3		8	√	5	
24	4		4		8	√	8	√

Número de jueces = 8, para que exista diferencia significativa ($\alpha \leq 0.05$) se requiere de al menos 6 juicios correctos.

En particular, el prototipo elaborado con la bacteria filante solo mostró diferencias al inicio del experimento, no hubo diferencias entre tratamientos después de 11 días de almacenamiento. En cuanto a la prueba CATA se les pidió a los panelistas que evaluaran si percibían los atributos positivos y negativos establecidos durante el entrenamiento. Los atributos negativos que mencionaron 6 de los 8 panelistas en el

producto elaborado con la bacteria probiótica era un olor rancio, lo cual esta en concordancia con la Figura 39, que establece que hay mayor oxidación con esta bacteria, mostrando evidencia que la bacteria filante podría servir de protección para estos propósitos, como se ha discutido anteriormente.

Los resultados de estas pruebas sensoriales de olor están en concordancia con las de color, ya que se observan cambios en los prototipos a los cuales se les han agregado BAL, como puede observarse en la Tabla 23. En cuanto a las pruebas CATA se observó que después de 24 d de almacenamiento se presentaron características de oxidado (5/8 panelistas), opaco (4/8 panelistas) y desagradable (4/8 panelistas). Las características negativas al combinar ambas bacterias fueron de oxidado y opaco (4/8), no observándose el atributo de desagradable, que pudiera ser atribuido a un efecto protector inducido por las bacterias filantes al combinar las bacterias de estudio.

Tabla 23. Pruebas triangulares de color con relación al tiempo en pruebas almacenadas a 6°C durante 24 d.

Tiempo de almacenamiento (d)	PRUEBAS ANALIZADAS							
	Control bajo condiciones de almacenamiento		Prototipo elaborado con <i>Lb. 2772</i>		Prototipo elaborado con <i>Lb. GG</i>		Prototipo elaborado con <i>Lb GG</i> y <i>Lb. 2772</i>	
5	5		6	√	7	√	3	
7	5		7	√	5		8	√
11	8	√	8	√	7	√	8	√
18	7	√	7	√	8	√	8	√
24	4		8	√	8	√	8	√

Número de jueces = 8, para que exista diferencia significativa ($\alpha \leq 0.05$) se requiere de al menos 6 juicios correctos.

6.6.5. Análisis Microbiológicos

Se analizó (Fig. 41) el crecimiento de las BAL en los prototipos cárnicos con relación al tiempo y se observó que en el tratamiento control no se desarrolló ninguna BAL durante el tiempo de estudio. Las BAL se desarrollaron como microbiota dominante durante el tiempo de almacenamiento, debido a que estas crecen favorablemente bajo condiciones anaeróbicas y su crecimiento se puede ver potenciado con la inclusión de la inulina de

achicoria. Se observó también que cuando se añade la combinación de BAL, la fase lag se hace mas larga y se recorre por lo tanto la fase de crecimiento exponencial.

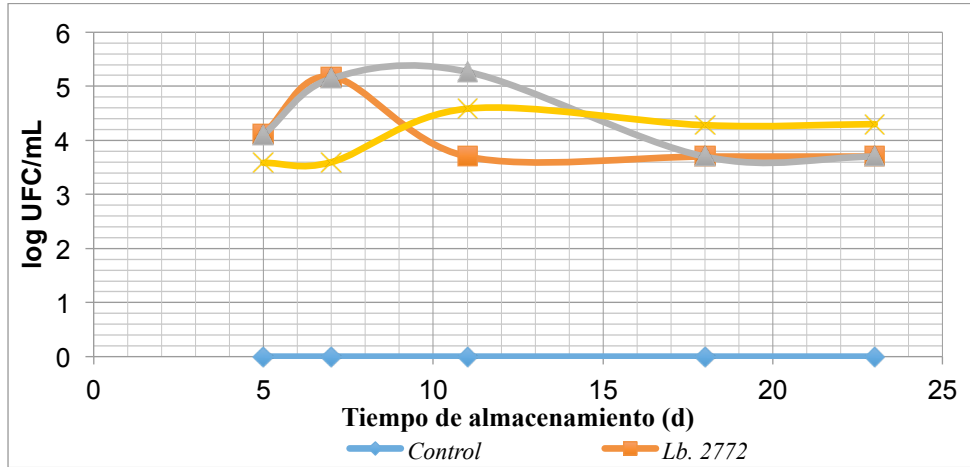


Figura 41. Crecimiento de las BAL de estudio en el prototipo almacenado a 6° C durante 24 d.

En la Fig. 42, se observó que la bacteria filante (*Lb. 2772* y *Lb. GG*) presenta una constante de velocidad de crecimiento de 1.7 d^{-1} , seguido por la combinación de ambas bacterias, con una velocidad de crecimiento de (1.65 d^{-1}). El crecimiento lento podría garantizar un mejor resultado en los prototipos cárnicos, ya que un crecimiento acelerado podría afectar a las características fisicoquímicas y sensoriales del producto disminuyendo la vida de anaquel.

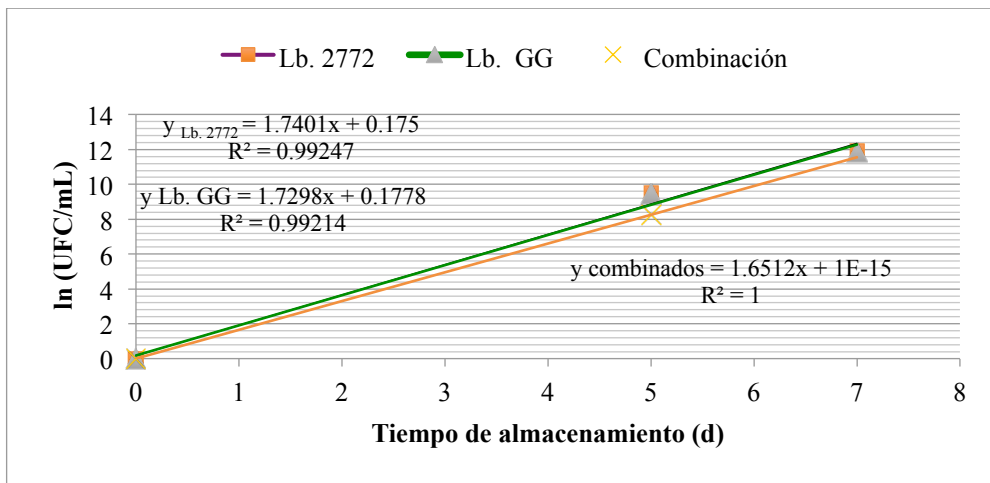


Figura 42. Cálculo de la velocidad de crecimiento (μ) de las BAL desarrolladas en el sistema cárnico, almacenado a 6° C..

En la Tabla 24, se observa como se desarrollaron las BAL durante el almacenamiento hasta alcanzar el punto máximo de su crecimiento, como se muestra en las Figuras 41 y 42. Al aumentar la temperatura se obtuvo un mayor crecimiento de las BAL, esto concuerda con resultados publicados previamente donde establecen que el crecimiento de estas bacterias en carne pudiera ser mayor al aumentar la temperatura (Kolozyn-Krajewska y Dolatowski, 2012). Esta característica es algo muy positivo en la industria de alimentos, ya que en caso de existir abuso de temperaturas, se le estará dando condiciones óptimas de desarrollo a las BAL para que puedan producir: ácido láctico, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, aumentando la bioconservación del medio cárnico.

Tabla 24. Desarrollo de bacterias ácido lácticas a diferentes temperaturas después de 7 d de almacenamiento

	<i>Control</i>	<i>Lb. 2772</i>	<i>Lb. GG</i>	<i>Tratamiento combinado</i>
	UFC/mL			
6 °C	0	1.50E+05	1.39E+05	3.95E+03
16 °C	0	9.90E+04	4.26E+04	5.00E+03
26 °C	0	1.97E+06	2.50E+06	2.50E+06
36 °C	0	1.85E+06	2.50E+06	2.50E+06

Por otro lado, el hecho de que las BAL adicionadas al prototipo cárnico con prebióticos permite considerarlo como un simbiótico. Es decir, que en el etiquetado del producto se debería establecer que: *el producto tiene microorganismos vivos, que cuando se administran en cantidades apropiadas, confieren al huésped un beneficio para la salud* (FAO, 2006). Actualmente, en nuestro país no existe una NOM que legisle a los probióticos adicionados en alimentos.

En la Tabla 25 se observó que hubo inhibición por parte de las BAL adicionadas en el prototipo cárnico sobre las bacterias coliformes al compararlo con el control en cuanto a las UFC/mL en placa, confirmando la bioconservación de estas bacterias de estudio en el prototipo cárnico marinado listo para comer. Es interesante observar que la combinación de las BAL de estudio presentan una inhibición superior al 70% desde el inicio del almacenamiento.

Tabla 25. Porcentaje de inhibición de bacterias coliformes observada al aplicar BAL en los sistemas cárnicos.

Porcentaje de Inhibición (%)			
Días	Lb. 2772	Lb. GG	combinación de bacterias
5	33.33	40.00	82.22
7	36.73	57.14	71.43
11	92.50	90.00	92.50
18	78.57	100.00	71.43

El ejemplo más claro de bioconservación puede observarse en la Figura 43 donde se muestra el abombamiento de uno de los paquetes del prototipo control debido a la producción de gas en el medio, indicativo de la presencia de coliformes, en el resto de los tratamientos analizados no se observó producción de gas. La vida de anaquel de la carne empacada esta determinada principalmente por la actividad de los microorganismos, que resulta en el desarrollo de olores desagradables, producción de gas y de una biopelícula (Sun y Holley, 2012). En este caso, se observó como las BAL del sistema no permitieron la producción de gas.



Figura 43. Muestras almacenadas durante 6 días a 36°C.
Donde: Izquierda prototipo con tratamiento de BAL: *Lb. GG*, *Lb. 2772* y la combinación de ambas, derecha prototipo control.

6.7. Cálculo de Vida de Anaquel

La vida de anaquel puede ser considerada como el período de tiempo durante en el cual el producto es almacenado hasta alcanzar el momento en el que no cumpla con las especificaciones desde el punto de vista de seguridad alimentaria, nutricional o desde el enfoque de sus propiedades sensoriales y fisicoquímicas (Giménez *et al.*, 2012). En el prototipo cárnico marinado, el parámetro sensorial que puede verse más afectado es el color, por lo cual es la variable adecuada para hacer el cálculo de vida de anaquel. En la Figura 44 se observan las velocidades de reacción con relación al cambio de color, al compararlo con el control a temperatura 36 °C. Unas gráficas similares se realizaron con las temperaturas de 6 °C y 26 °C a fin de poder hacer el cálculo correspondiente que para determinar la velocidad de reacción que se muestran en la Tabla 26.

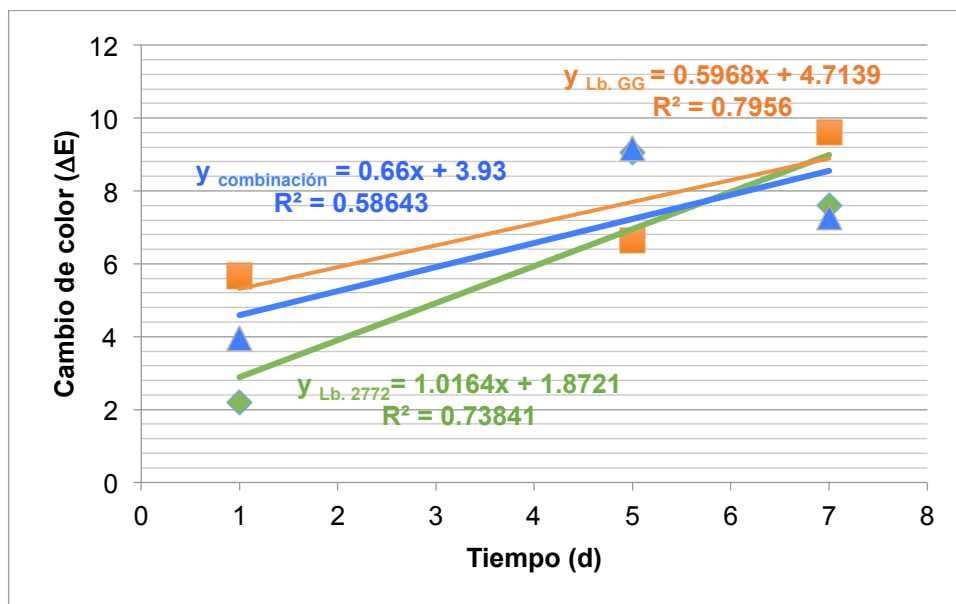


Figura 44. Cálculo de las velocidades de reacción a 36°C con respecto al cambio de color (ΔE) de productos cárnicos inoculados con BAL.

Tabla 26. Cálculo de la constante de la velocidad de reacción (k) a cada una de las distintas temperaturas de estudio.

Temp	<i>Lb. 2772</i>	<i>Lb. GG</i>	<i>Combinada</i>
6 °C	0.2312	0.013	0.3271
26° C	0.47	0.25	0.05
36 °C	1.01	0.5968	0.66

Con base en esta información se calcula $Q_{10} = k_{36}/k_{26}$ (Tabla 27), lo que permite identificar que hubo mayor deterioro con la adición de la bacteria probiótica seguida de la bacteria filante. Además, se observó que la combinación de cepas si permitió un menor deterioro del color. Es decir, que se observó un efecto combinado para prevenir la disminución de la calidad del color del producto cárnico marinado al incluir la bacterias combinadas, atribuido a la bacteria filante.

Tabla 27. Cálculo de Q_{10} en los prototipos sembrados con las bacterias ácido lácticas.

	<i>Lb. 2772</i>	<i>Lb. GG</i>	<i>Combinada</i>
Q_{10}	2.14	2.36	1.32

Los valores de Q_{10} no son constantes y dependen de la energía de activación (E_a) y de la temperatura. Por ejemplo, en productos congelados estos valores pueden ser de 2 a 20 (Fu y Labuza, 1997). Se ha reportado que existen reacciones en alimentos relacionadas con la E_a , donde un valor menor a 2 esta relacionada con reacciones enzimáticas e hidrolíticas. Una E_a dentro del rango de 3 a 5 esta relacionada con pérdida de nutrientes y oxidación de lípidos. Finalmente, E_a mayor a 6 esta relacionada con obscurecimiento no enzimático (Taoukis *et al.*, 1997).

Por ello, se utilizó la ecuación de Arrhenius (Fig. 45) a fin de conocer el cambio correspondiente de velocidad de deterioro del producto. La energía de activación (E_a) podría considerarse como la barrera de energía que las variables de estudio (físicoquímica, microbiológica o sensorial) deben cruzar a fin de que el producto se degrade (Taoukis *et al.*, 1997). Esta se calculó en base a la pendiente de la Figura 45 y sobre ella se hizo un ajuste en base a la constante de los gases (R). Los datos demuestran que cuando se utiliza únicamente la bacteria probiótica en el sistema cárnico la E_a es mayor, lo cual concuerda con los datos presentados previamente. Se puede observar que las bacterias combinadas tienen una R muy baja que puede explicarse a que su E_a es muy baja.

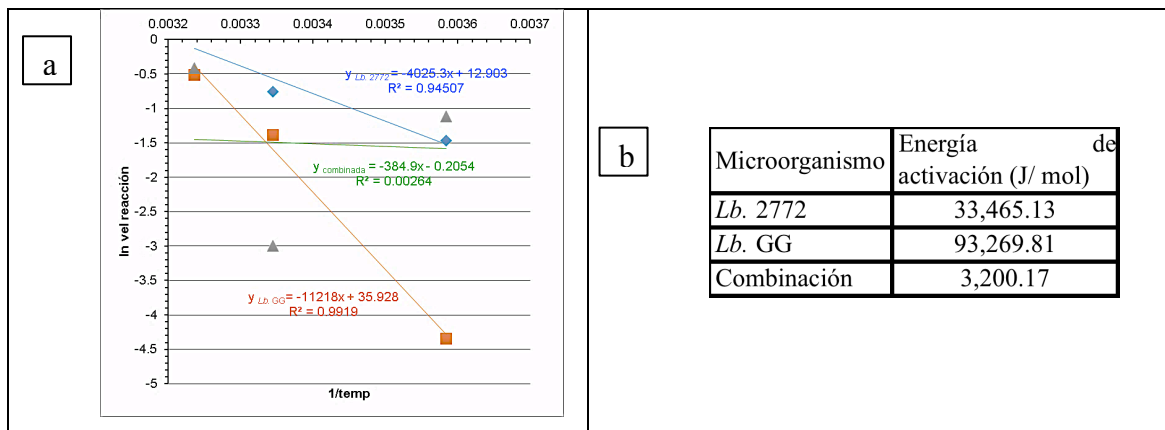


Figura 45. Cálculo de Energía de activación.

(a) Gráfica utilizada para calcular la Energía de Activación (E_a) a través de la pendiente obtenida mediante la regresión lineal, (b) Cálculo de la energía de activación realizando ajuste en base a la constante de los gases (R).

Con esta información y con la ecuación de Arrhenius se calculó la vida de anaquel de los productos cárnicos marinados (Tabla 28), se constató que la vida de anaquel es dependiente de la temperatura y del tipo BAL que se utilizó

Tabla 28. Vida de Anaquel establecida por pérdida de color en prototipos elaborados con BAL almacenadas a diferentes temperaturas.

Temperatura	Bacterias ácido lácticas de estudio		
	<i>Lb. 2772</i>	<i>Lb. GG</i>	<i>Combinada</i>
6 °C	10 d	Más 10 d	7d
26 °C	9 d	9 d	Más 10 d
36 °C	3 d	4 d	4 d

Los resultados mostraron que en condiciones de abuso de temperatura, los productos cárnicos que utilizaron las BAL como cultivos bioprotectores tienen una vida de anaquel mayor a la reportada por las empresas empacadoras de carne en el Estado de Aguascalientes, lo que pone en evidencia los beneficios de la bioconservación. Para la implementación de un modelo de vida de anaquel adecuado en las cadenas de suministro de las industrias cárnicas se requiere monitorear las temperaturas y tiempos que van desde la elaboración, distribución y almacenamiento del producto. Esta información puede ser usada para optimizar las decisiones de primeras entradas-primeras salidas y el concepto de menos vida de anaquel (Bruckner *et al.*, 2013).

7. Conclusiones

Se diseñó la formulación de un producto funcional bioconservado marinado de cerdo listo para comer con la técnica de *Sous Vide*, cuyas características en base al análisis de segmentación; y las pruebas de justamente correcto (JAR) y pruebas de penalidades, son:

1) El prototipo elaborado, es una buena fuente de fibra de acuerdo a la legislación mexicana, debido a que tiene un porcentaje de inulina de 2.8% (NOMX-086-SSA1-201), de tal forma que puede ser considerado como un producto funcional.

2) Se analizó el factor prebiótico de los ingredientes utilizados en la marinada, demostrando que el chipotle, ajo y romero, tuvieron un índice prebiótico superior a 1.

Las fibras que tuvieron un índice prebiótico mayor a 1 fueron la fibra de maíz y la inulina de achicoria.

La formulación que presentó la mejor aceptación fue la elaborada con inulina de achicoria, haciéndolo a este el mejor prototipo.

3) En cuanto al efecto bacteriocida o bacteriostático de los cultivos iniciadores al probarlos contra *E. coli* y *L. innocua*, fue demostrado. El porcentaje de inhibición fue de alrededor del 80% para estos microorganismos indicadores.

4) El efecto de bioconservación se demostró en los prototipos cuando las bacterias ácido lácticas fueron inoculadas de manera individual. La combinación de bacterias probiótica (*Lb. rhamnosus* GG) y filante (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772) permitió que se desarrollaran estas más lentamente y se mantuvo la calidad en términos fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales por mayor tiempo. De tal forma, que se puede suponer que la bacteria filante tiene un efecto protector que puede ser atribuido al exopolisacárido producido.

5) Se favoreció el desarrollo de las BAL al someter el prototipo a temperaturas de abuso (26°C y 36°C); lo que implica una mayor producción de bacterias ácido lácticas y de sus subproductos que garanticen la bioconservación del producto cárnico.

6) Las bacterias probióticas se desarrollaron en el prototipo, de tal forma que puede considerarse un producto probiótico, o bien simbiótico, en virtud de que se tiene presente un prebiótico y un probiótico.

7) Se determinó la vida de anaquel de los prototipos desarrollados, por medio de la ecuación de Arrhenius, con el color como variable determinante de compra. Al comparar la vida de anaquel del producto almacenado a 6°C con relación al de los prototipos en general, no se encontró diferencia (12 d). Sin embargo, en condiciones de abuso de temperatura se obtuvo una vida de anaquel mayor, haciendo patente los efectos benéficos de la bioconservación.

8. Bibliografía

1. Al-Sheraji, S.H., Ismail, A., Manap, M.Y., Mustafa, S., Yusof, R.M. y Hassan, A. (2013). Prebiotics as functional foods: a review, *J Funct. Foods* 5,1542-1553.
2. Álvarez-Coureaux, Y. y Manresa-González, A. (2012). Contribución de tres modelos en pruebas sensoriales de diferencia, *Tecnociencia Chihuahua* 3, 165-173.
3. Ares, G., Cunha de Andrade, J., Antúnez, L., Alcaire, F., Swaney-Stueve, M., Gordon, S. and Jaeger, S.R. (2017). Hedonic product optimization: CATA question as alternatives to JAR scales, *Food Qual. Prefer.* 55, 67-78.
4. Armenteros, M. Heinonen, M., Ollilainen, V., Toldrá, F., Estévez, M. (2009). Analysis of protein carbonyls in meat products by using the DNPH-method, fluorescence spectroscopy and liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry (LC-ESI-MS). *Meat Sci.* 83, 104-112.
5. Aymerich, M.A. y Hugas, M. (1998). Estado actual de la bioconservación en productos cárnicos, *Eurocarne* 72, 39-51.
6. Baer, A.A., Miller, M. J., y Dilger, A.C. (2013). Pathogens of Interest to the Pork Industry: A review of Research on Interventions to Assure Food Safety, *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.* 12, 183-217.
7. Baldwin, D.E. (2012) *Sous vide cooking: A review*, *I. J. G. F. S.* 1, 15-30.
8. Bassi, L., Hassouna, M., Shinzato, N. y Matsui, T. (2009). Biopreservation of Refrigerated and Vacuum-Packed *Dicentrarchus labrax* by Lactic Acid Bacteria. *J. Food Sci.* 74, 335-339.
9. Bekarem (2013). Escuela de Embutidos para Avanzados: Elaboración de productos cárnicos. Conferencia impartida del 23 al 25, Aguascalientes en el Foro Si Carne.
10. Benezech, T. y Maingonnat, J.F. (1993). Characterization of the rheological properties of yoghurt, A Review *J. Food Eng.* 21, 447-472.
11. Blatchford, P., Ansell, J., de Godoy, M.R.C., Fahey, G., García-Mazcorro, J.F., Gibson, G.R., Goh, Y.J., Hotchkiss, A.T., Hutkins, R., LaCroix, C., Rastall, R.A,

- Reimer, R.A., Schoterman, M., Vand Sinderen, D., Venema, K. y Whelan, K. (2013). Prebiotic Mechanisms, Functions and Applications: A Review, *Int. J. Probiotics Prebiotics* 8, 109-132.
12. Braña Varela, D., Ramírez Rodríguez, E., Rubio Lozano, M. de la S., Sánchez Escalante, A., Torrescano Urrutia, G., Arenas de Moreno, M.L, Partida de la Peña, J.A., Ponce Alquicira, E. y Rios Rincón, F.G. (2011). Manual de Análisis de calidad en muestras de carne, Centro de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal, *INIFAP*, 10-13.
 13. Brilliet, A., Pilet, M., Prevost, H., Bouttefroy, A. y Leroi, F. (2004). Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon, *J. Appl. Microbiol.* 97, 1029-1037.
 14. Bruckner, S. Albrecht, A., Petersen, B., Kreyenschmidt, J. (2013). A predictive shelf life model as a tool for improvement of quality management in pork and poultry chains, *Food Control* 29,451-460.
 15. Buruiana, CT., Gómez, B., Vizireanu, C. y Garrote, G. (2017). Manufacture and evaluation of xylooligosaccharides from corn stover as emerging prebiotic candidates for human health, *LWT-Food Sci. Technol.* 77, 449-459.
 16. Cao, Y., Gu, W., Zhang, J., Chu, Y., Ye, X., Hu, Y y Chen, J. (2013). Effects of chitosan aqueous extrac of ginger, onion and garlic on quality and shelf life of stewed-pork during refrigerated storage, *Food Chem.* 141, 1655-1660.
 17. Cardoso Pereira, P.M. y Baltazar Vicente, A.P. (2013). Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet, *Meat Sci.* 93, 586-592.
 18. Castellano, P. P. y Vignolo, G. G. (2006). Inhibition of *Listeria innocua* and *Brochothrix thermosphacta* in vacuum-packaged meat by addition of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* CRL705 and its bacteriocins, *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 194-199.
 19. Chamorro-Ramírez, F.H., González-Sánchez, J.F., Medina-González, O., Azpe-Franco, A. y Arce-Jurado, G. (2013). Desarrollo de Hamburguesas adicionadas con fibra de nopal (*Opuntia ficus-indica*) y cacao en polvo (*Theobroma cacao*), características nutritivas, físicoquímicas y sensoriales, *Nacameh* 7, 97-108.

20. Chen, B., McClements, D.J. y Decker, E.A. (2013). Design of Foods with Bioactive Lipids for Improved Health, *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 4, 35-56.
21. Chica Cardona, B.A. y Osorio Saldarriaga, S. L. (2003). Determinación de la vida de anaquel del chocolate de mesa sin azúcar en una película de polipropileno biorientado, *Tesis de la Universidad Nacional de Colombia.* 24-25.
22. Chinprahast, N., Suwannadath, A. y Homjabok, T. (2012). Use of rosemary (*Rosmarinus officianalis L.*) leaf for improving oxidative stability of microwave precooked traditional Thai pork patty and its frozen storage trial. *Int. J. Food Sci. and Technol.* 47, 2165-2175.
23. Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I. Y Heinrich, M. (2014). *Hibiscus sabdarrifa L.*- a phytochemical and pharmacological review. *Food Chem.* 165, 424-443.
24. Davidson, P.M., Critzer, F.J. y Taylor, T.M. (2013). Naturally Ocurring Antimicrobials for minimally processed foods. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 4, 163-190.
25. Dawn D. T., Umberger, W. J. y Ziehl A. R. (2006). Strategic market planning for value-added natural beef products: A cluster analysis of Colorado consumers, *Renewable Agriculture and Food Systems* 21,192-203.
26. Decker, E.A. y Park, Y. (2010). Healthier meat products as functional foods. *Meat Sci.* 86, 49-55
27. De la Plaza, M. Llanos, P., Pelayo, M.S., Zugasti, B., Zuleta, A. (2013). Revisión actualizada de los hidratos de carbono. Su implicancia en el tratamiento nutricional de la diabetes, *Actualización en Nutrición* 14,88-107.
28. Del Pulgar, J., Roldan, M. y Ruiz-Carrascal, J. (2013). Volatile compounds profile of sous-vide cooked pork cheeks as affected by cooking conditions (vacuum packaging, temperature and time), *Molecules* 18, 12538-12547.
29. Delwiche, J. (2007). Thurstonian probabilistic approaches to new food product development. En: *Consumer Led Food Product Development*, Ed. por: H. MacFie, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Reino Unido, 456-470.
30. Deveau, D. (2011). Sous-Vide, *Caterer & Hotelkeeper* 201,33.
31. Diario Oficial de la Federación (11 de julio del 2015). Norma Oficial Mexicana

- (NOM-213-SSA1-2002), Productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de Prueba. 51-63.
32. Díaz-Carreño, M.A., Mejía-Reyes, P., Del Moral Barrera, L.E. (2007). Análisis económico de la Carne de Cerdo en Canal en México, *Análisis Económico* 2007 XXII, 237-287.
 33. Díaz, P., Nieto, G., Garrido, M.D. y Bañón, S. (2008). Microbial, physical-chemical and sensory spoilage during the refrigerated storage of cooked pork loin processed by the *sous vide* method, *Meat Sci.* 80, 287-292.
 34. Di Gioia, D., Mazzola, G., Nikodinoska, I., Aloisio, I., Langerholc, T., Rossi, M., Raimondi, S., Melero, B., Rovira, J. (2016). Lactic acid bacteria as protective cultures in fermented pork meat to prevent *Clostridium* spp. growth, *Int. J. Food Microbiol.* 235, 53-59.
 35. Domínguez-Soberanes, J. (1997). Caracterización reológica y de textura de un producto fermentado producido por *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* NCFB 2772. Tesis de maestría. UAM- Iztapalapa.
 36. Domínguez-Soberanes, J., García-Garibay, M., Casas-Alencaster, N.B. y Martínez-Padilla, L.P. (2001). Instrumental texture of set and stirred fermented milk. Effect of a ropy strain of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and an enriched substrate, *J. Texture Stud.* 32, 205-217.
 37. Embuscado, M. E. (2015). Spices and herbs: natural sources of antioxidantes-a mini review, *J. Funct. foods* 18, 811-819.
 38. Ennis, D.M., Rousseau, B., Ennis, J.M. (2014). Tools and Applications of Sensory and Consumer Science, IF Press, 57-94.
 39. Ennis, D.M., Ennis, J.M. (2013). Mapping hedonic data: A process perspective, *Journal of Sensory Studies* 28, 324-334.
 40. Escudero Álvarez, E. y González Sánchez (2006). La fibra dietética, *Nutrición Hospitalaria* 21, 61-72.
 41. Fall, P. A., Leroi, F., Cardinal, M., Chevalier, F. y Pilet, M. F. (2010). Inhibition of *Brochothrix thermosphacta* and sensory improvement of tropical peeled cooked shrimp by *Lactococcus piscium* CNCM I-4031, *Lett. Appl. Microbiol.* 50, 357-361.

42. Font-i-Furnols, M. y Guerrero L. (2014). Consumer preference, behaviour and perception about meat and meat products: an overview, *Meat Sci.* 98, 361-371.
43. Forsythe, S.J. y Hayes, P. R. (2012). Higiene de los Alimentos, Microbiología y HACCP (2^{nda} Ed.), Ed. Acribia, España, 113.
44. Fox, B. y Cameron, A. (2009). Ciencia de los Alimentos, nutrición y salud. Ed. Limusa, México, 321-343.
45. Fu, B. y Labuza, Th. P. (1997). Shelf- Life Testing procedures and prediction Methods, En: *Quality in Frozen Foods*, Ed. por: Erickson, M. y Hung, Y.C., Springer Science and Business Media, EUA, 377-415.
46. Fuller, G.W. (2011). New Food Product Development: From Concept to Marketplace (3^{era} Ed.), CRC Press Taylor and Francis Group, EUA, 65, 238-248.
47. Gacula, J.R., Rutenbeck S., Pollack, L., Resurreccion, A.A. y Moskowitz, H.R. (2007). The Just About Right Intensity Scale: Functional Analyses and Relation to Hedonics. *J. Sens. Stud.* 22, 194-211.
48. Gallegos-Infante, J.A., Rocha-Guzmán, N.E., González-Lardo, R.F., Reynoso-Camacho, R., Medina-Torres, L. y Cervantes-Cardozo, V. (2009). Effect of air flow rate on the polyphenols content and antioxidant capacity of convective dried cactus pear cladodes (*Opuntia ficus indica*), *Int. J. Food Sci. and Technol.* 60, 80-87.
49. Gálvez, A., López, R., Abriouel, H., Valdivia, E., y Ben Omar, N. (2008). Application of Bacteriocins in the Control of Foodborne Pathogenic and Spoilage Bacteria, *Crit. Rev. Biotechnol.* 28,125-152.
50. Gänzle, M. y Gobbetti, M. (2013). Physiology and Biochemistry of Lactic Acid Bacteria, En: *Handbook of Sourdough Biotechnology*, Ed. por: Gänzle, M. y Gobbetti, M., Springer Science, EUA, 183-214.
51. Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2, 106-117.
52. García-Segovia, P., Pagán Moreno, M. J. y Martínez-Monzó, J. (2014). *Texture in Meat and Fish Products*. En: *Methods in Food Analysis*, Ed. por: Cruz, R.M.S., Khmelinskii, I., y Vieira, M., CRC Press, EUA, 76-109.

53. Gao, M., Feng, L., Jiang, T., Zhu, J., Fu, L., Yuan, D., y J. Li. (2014). The use of rosemary extract in combination with nisin to extend the shelf life of pompano (*Trachinotus ovatus*) fillet during chilled storage, *Food Control* 37, 1-8.
54. Gerbaldo, G., Barberis, C., Pascual, L., Dalcerro, A., y Barberis, L. (2012). Antifungal activity of two *Lactobacillus* strains with potential probiotic properties, *FEMS Microbiol. Lett.* 332, 27-33.
55. Ghalfi, H. H., Benkerroum, N. N., Doguiet, D. K., Bensaid, M. M., y Thonart, P. P. (2007). Effectiveness of cell-adsorbed bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 and selected essential oils to control *Listeria monocytogenes* in pork meat during cold storage, *Lett. Appl. Microbiol.* 44, 268-273.
56. Gibis, M. y Weiss, J. (2012). Antioxidant capacity and inhibitory effect of grape seeds and rosemary extract in marinades on the formation of heterocyclic amines in fried beef patties, *Food Chem.* 134, 766-774.
57. Gil-Chávez, G.J., Villa, J.A., Ayala-Zavala, J.F., Heredia, B., Sepulveda, D., Yahia, E.M. y González-Aguilar, G.A. (2013). Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview, *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.* 12, 5-23.
58. Giménez, A., Ares, F. y Gastón, A. (2012). Sensory shelf-life estimation: a review of current methodological approaches, *Food Res. Int.* 49, 311-325.
59. González-Herrera, S.M., Rodríguez Herrera, R. Guadalupe López, M. Rutiaga, O.M. Aguilar, C.N., Aguilar, C.N., Contreras Esquivel, J.C., Ochoa Martínez, L.A. (2015). Inulin in food products: prebiotic and functional ingredient, *Brit. Food J.* 117, 371 – 387.
60. Grattepanche, F., y Lacroix, C. (2010). Capítulo 25. Production of high-quality probiotics using novel fermentation and stabilization technologies. En: *Biotechnology in Functional Foods and Nutraceuticals*, Ed. por: Bagchi, D., Lau, F., y Ghosh, D.K., CRC Press, EUA, 361-388.
61. Gutiérrez-Merino, J. (2006). Caracterización inmunoquímica de la enterocina P y evaluación de su clonación, producción y expresión funcional en *Escherichia coli*, *Methylobacterium extorquens*, *Lactococcus lactis* y *Pichia pastoris*. Tesis

Doctoral. Madrid, España.

62. Hammami, R., Zouhir, A., Lay, C., Hamida, J., y Fliss, I. (2010). BACTIBASE second release: a database and tool platform for bacteriocin characterization, *BMC Microbiol.* 101-5.
63. Harutoshi, T. (2013). Chapter 22: Exopolysaccharides of lactic acid bacteria for food and colon health applications en: *Lactic Acid Bacteria- R&D for Food, Health and Livestock Purposes*. Editado por: Kongo, J. M., INTECH Open Access Publisher. 515-535.
64. Hess, S.J., Roberts, R.F. y Ziegler, G.R. (1997). Rheological Properties of nonfat yogurt stabilized using *Lactobacillus delbrueckii* sssp. *bulgaricus* producing exopolysaccharide of using commercial stabilizer systems, *J. Dairy Sci.* 80, 252-263.
65. Hleap J. I. y Velasco V. A. (2010). Análisis de las propiedades de textura durante el almacenamiento de salchichas elaboradas a partir de tilapia roja (*Oreochromis sp.*), *Facultad de Ciencias Agropecuarias* 8, 46-56.
66. Hong, J.H., Yoon, E.K., Chung, S.J., Chung, L., Cha, S.M., O'Mahony, M., Vickers, Z. y Kim, K.O. (2011). Sensory Characteristics of Cross-Cultural Consumer Acceptability of Bulgogi (Korean Traditional Barbecued Beef), *J. Food Sci.* 76, S306-S313.
67. Illanes, A. (2015). Alimentos funcionales y biotecnología, *Rev. Colomb. Biotecnol.* 1, 5-8.
68. Jacobsen, T., Budde, B. y Koch, A. (2003). Application of *Leuconostoc carnosum* for biopreservation of cooked meat products, *J. Appl. Microbiol.* 95, 242-249.
69. Jaeger, S.R., Cadena, R.S., Torres-Moreno, M., Antúnez, L., Vidal, L., Giménez, A., Hunter, D.C., Beresford, M.K., Kam, K., Yin, D., Paisley, A.G., Chheang, S.L. y Ares, G. (2014). Comparison of check-all-that-apply and forced-choice Yes/No question formats for sensory characterisation, *Food Qual. Prefer.* 35, 32-40.
70. Jarvis, N., Clement, A.R., O'Bryan, Babu, D., Crandall, P.G., Owens, C.M., Meullenet, J.F. y Ricke, S.C. (2012). Dried Plum Products as a Substitute for

Phosphate in Chicken Marinade, *J. Food Sci.* 77, S253-S257.

71. Jiménez-Aguilar, D.M., López-Martínez, J.M., Hernández-Brenes, C., Gutiérrez-Uribe, J.A., Welti-Chanes, J. (2015). Dietary fiber, phytochemical composition and antioxidant activity of Mexican commercial varieties of cactus pear, *J. Food Comp. Anal.* 41, 66-73.
72. Kanmani, P., Kumar, R. S., Yuvaraj, N., Paari, K.A., Pattukumar, V. y Arul, V. (2013). Probiotics and Its Functionally Valuable Products- A review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition- A Review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53, 641-658.
73. Kim, Y.J., Jin, S.K., Park, W.Y., Kim, B.W., Joo, S.T. y Yang, H.S. (2010). The effect of garlic or onion marinade on the lipid oxidation and meat quality of pork during cold storage, *J. Food Qual.* 33, 171-185.
74. Kolozyn-Krajewska, D. y Dolatowki, Z.J. (2012). Probiotic meat products and human nutrition, *Process Biochemistry* 47, 1761-1772.
75. Kröckel, L. (2013). The role of lactic acid bacteria in safety and flavour development of meat and meat products. En: *Lactic acid bacteria—R & D for food, health and livestock purposes*. Editado por: Kongo, J. M. INTECH Open Access Publisher, 129- 152.
76. Kuntz, M.G.F., Fiates, G.M.R., Teixeira, E. (2013). Characteristics of prebiotic food products containing inulin, *BFJ* 115, 235-251.
77. Kodali, V. P., Das, S. y Sen, R. (2009). An exopolysaccharide from a probiotic: Biosynthesis dynamics, composition and emulsifying activity, *Food Res. Int.* 42, 695-699.
78. Labuza, T. P., y Altunakar, B. (2007). Capítulo 5. Water Activity Prediction and Moisture Sorption Isotherms. En: *Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications*, Editado por: Barbosa-Cánovas, G., Fontana, A.J. Schmidt, S.J., Labuza, T.P., Blackwell Publishing and the Institute of Food Technologists, EUA, 109.
79. Labuza, T.P. (1982). Shelf-life: Dating of foods, *Food and Nutrition Press, Inc.* EUA, 25-41.

80. Lawless, H. T. (2013). Capítulo 13. Product Optimization, Just-About-Right (JAR) Scales, and Ideal Profiling En: *Quantitative sensory analysis: psychophysics, models and intelligent design*. Editado por: Lawless, H. T., John Wiley & Sons, EUA, 273-294.
81. Li, B., Hayes, J.E. y Ziegler, G.R. (2014). Just-about-right and ideal scaling provide similar insights into the influence of sensory attributes on liking, *Food Qual. Prefer.* 37,71-78.
82. Lück, E. y Jager, M. (1999). Conservación química de los alimentos: Características, usos y efectos. Ed. Acirbia. 2^{nda} Ed. España, 284,296.
83. Lund, M. N., Heinonen, M., Baron, C.P. y Estévez, M. (2011). Protein oxidation in muscle foods: a review, *Mol. Nutr. Food Res.* 55,83-95.
84. Marco, M.L., Pavan, S. y Kleerebezem, M. (2006). Towards understanding molecular modes of probiotic action, *Cur. Opin. Biotechnol.* 17, 204-210.
85. Masood, M. I., Qadir, M. I., Shirazi, J. H., y Khan, I. U. (2011). Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings. *Crit. Rev. Microbiol.*, 37(1), 91-98.
86. Marshall, V.M., Cowie, E.N. y Moreton, R.S. (1995). Analysis and production of two exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LC 330. *J. Dairy Res.* 62, 621-628.
87. Medina-Carrillo, R. E., Sumaya-Martínez, M.T., Machuca- Sánchez, M.L., Sánchez-Herrera, L.M., Balois-Morales, R., Jiménez-Ruiz, E.I. (2013). Actividad antioxidante de extractos de cálices deshidratados de 64 variedades de jamaica (*hibiscus sabdariffa* l.) en función de fenólicos y antocianinas totales, *RCTA* 22, 41-44.
88. McMullen, L. M., y Stiles, M. E. (1996). Potential for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. *J. Food Prot.*, 64-71.
89. McMurtrie, K.E. Kerth, C.R., Bratcher, C.L, Curtis, P.A. y Smith, B. (2012). Marination with natural curing ingredients, storage time, and serving temperature effects on the sensory characteristics of forage-finished or commercially-sourced beef roasts, *Meat Sci.* 90, 747-754.

90. Meadus, W. J., Turner, T. D., Dugan, M. R., Aalhus, J. L., Duff, P., Rolland, D., y ... Gibson, L. L. (2013). Fortification of pork loins with docosahexaenoic acid (DHA) and its effect on flavor, *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 4, 1-17.
91. Meyners, M., Castura, J.C. y Carr, B.T. (2013). Existing and new approaches for the analysis of CATA data, *Food Qual. Prefer.* 30, 309-319.
92. Miranda-de la Lama, G.C., Estévez-Moreno, L.X., Sepúlveda, W.S., Estrada-Chavero, M.C., Rayas-Amor, A.A., Villarroel, M. y María, G.A. (2017). Mexican consumers' perceptions and attitudes towards farm animal welfare and willingness to pay for welfare friendly meat products, *Meat Sci.* 125, 106-113.
93. Mobarez, A.M., Hosseini Doust, R., Sattari, M. y Mantheghi, N. (2008). Antimicrobial Effects of Bacteriocin Like Substance Produced by *L. acidophilus* from Traditional Yoghurt on *P. aeruginosa* and *S. aureus*. *J. Biol. Sci.* 8, 221-224.
94. Mondragón Preciado, G., Escalante Minakata, P., Osuna Castro, J.A., Ibarra Junquera, V.I., Morlett Chávez, J.A., Aguilar González, C.N. y Rodríguez Herrera R. (2013). Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos, *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes* 59, 63-69.
95. Moreno-Escamilla, J.O., De la Rosa, A., López-Díaz, J.A., Rodrigo-García, J., Núñez-Gastélu, J.A. y Alvarez-Parrilla, E. (2015). Effect of the smoking process and firewood type in the phytochemical content and antioxidant capacity of red Jalapeño pepper during its transformation to chipotle pepper, *Food Res. Int.* 76, 654-660.
96. Mossel, D.A.A., Moreno, B. y Struijk, C.B. (2006). Microbiología de los Alimentos (2^{nda} Ed), Ed. Acirbia, España, 276.
97. Mozzi, F. Savoy de Giori, D. y Font de Valdez, I. G. (2003). UDP-galactose 4-epimerase: A Key enzyme in exopolysaccharide formation by *Lactobacillus casei* CRL 87 in controlled pH batch cultures. *J. Appl. Microbiol.* 94:175-183.

98. Muñoz Ohmen, S. Á., Restrepo Molina, D. A. y López Vargas, J. H. (2014). Efecto de la Inclusión de Inulina en Salmueras de Marinado sobre Mermas y Calidad Sensorial de Pechugas de Pollo, *R.F.N.A.* 67 , 7219-7228.
99. Narayanan, P.P. Chinnasamy, B.B., Jin, L.L. y Clark, S.S. (2014). Use of just about right scales and penalty analysis to determine appropriate concentrations of stevia sweeteners for vanilla yogurt, *J. Dairy Sci.* 97, 3262-3272.
100. Ngapo, T.M., Martin, J.F. y Dransfield, E. (2007). International preferences for pork appearance: II. Factors influencing consumer choice, *Food Qual. Prefer.* 18, 130-151.
101. Nissen, H., Rosnes, J.T., Brendehaug, J. y Kleiberg, G.H. (2002). Safety evaluation of *sous-vide* processed ready meals, *Lett. Appl. Microbiol.* 35, 433-438.
102. Nurwantoro, Bintoro, V.P., Legowo, A.M., Prunomoadi, A. y Setiani, B.E. (2015). Garlic Antioxidant (*Allium sativum* L.) to Prevent Meat Rancidity, *Procedia Food Sci.* 3,137-141.
103. O'Brien, T. (2013). Mastering sous vide, *Restaurant Business* 112, M10.
104. Olmedilla-Alonso, B. y Jiménez-Colmenero, F. (2014). Alimentos cárnicos funcionales: desarrollo y evaluación de sus propiedades saludables. *Nutr. Hosp.* 29, 1197-1209.
105. Olmedilla-Alonso, B., Jiménez-Colmenero, F. y Sánchez-Muñiz, F.J. (2013). Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. *Meat Sci* 95, 919-930.
106. Onwulata, Ch. (2013). Microencapsulation and functional bioactive foods, *J. Food Process. Preserv.* 37, 510-532.
107. Ornelas-Paz, J.J., Martínez-Burrola, J.M., Ruiz-Cruz, S., Santana-Rodríguez, V., Ibarra-Junquera, V., Olivas, G.I. y Pérez-Martínez, J.D. (2010). Effect of cooking on the capsaicinoids and phenolics contents of Mexican peppers, *Food Chem.* 119,1619–1626.
108. Ospina, S, Restrepo, D. y López, J. (s.f) Derivados cárnicos como alimentos funcionales, *Rev. Lasallista investig.*, Vol. 8 No. 2

109. Ouwehand, A. C. y Vesterlund, S. (2004). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. *Food Sci. Technol. - New York- Marcel Dekker*, EUA, 139, 375-396.
110. Paari, A. A., Kanmani, P. P., Satishkumar, R. R., Yuvaraj, N. N., Pattukumar, V. V. y Arul, V. V. (2012). Potential Function of a Novel Protective Culture *Enterococcus faecium*- MC13 Isolated From the Gut of *Mughilcephalus*: Safety Assessment and its Custom as Biopreservative, *Food Biotechnol.* 26, 180-197.
111. Palanca, V., Rodríguez, E., Señoráns, J. y Reglero, G. (2006). Bases científicas para el desarrollo de productos cárnicos funcionales con actividad biológica combinada, *Nutr. Hosp.* 21, 199-202.
112. Palframan, R., Gibson, G.R., y Rastall, R.A. (2003). Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides, *Lett. Appl. Microbiol.* 37, 281-284.
113. Papagianni, M., Avramidis, N., Filioussis, G., Dasiou, D., y Ambrosiadis, I. (2006). Determination of bacteriocin activity with bioassays carried out on solid and liquid substrates: assessing the factor" indicator microorganism. *Microb. Cell Fact.* 5, 1-14.
114. Parra Huertas, R. A. (2010). Review lactic acid bacteria: functional role in the foods, *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 8, 93-105.
115. Pérez-Chabela, M. de L. y Ramírez-Chavarín, N.L. (2007). Utilización de bacterias lácticas termorresistentes como probióticos en productos cárnicos cocidos, *NACAMEH* 1, 87-96.
116. Pérez-Méndez, L. Tejera-Flores, F, Darias Martín, J., Rodríguez-Rodríguez, E.M., y Díaz Romero, C. (2015). Physicochemical characterization of cactus pads from *Opuntia dillenii* and *Opuntia ficus indica*, *Food Chem.* 188, 393-398.
117. Pompei, A., Cordisco, L., Raimondi, S., Amaretti, A., Pagnoni, U.M., Matteuzzi, D. y Rossi, M. (2008). *In vitro* comparison of prebiotic effects of two inulin-type fructans, *Anaerobe* 14, 280-286.
118. Popper, R. (2014). Use of Just-About-Right-Scales in Consumer Research, En: *Novel Techniques in Sensory Characterization and Consumer Profiling*, Ed. por: Varela, P. y Ares, G. CRC Press, EUA, 137-156.

119. Porep, J.U., Kammerer, D.R. y Carle, R. (2015). On-line application of near infrared (NIR) spectroscopy in food production, *Trends Food Sci and Technol* 46, 211-230.
120. Potter, N., y Hotchkiss, J. (2007). Ciencia de los Alimentos. Ed. Acribia. España.
121. Prevolnik, M., Candek-Potokar, M. y Skorjanc, D. (2004). Ability of NIR spectroscopy to predict meat chemical composition and quality- a review, *Czech J. Anim. Sci.* 49, 500-510.
122. Prieto, N., Roehe, R., Lavín, P., Batten, G. y Andrés, S. (2009). Applications of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat and meat products quality: A review. *Meat Sci.* 83, 175-186.
123. Quelhas, I., Petisca, C., Viegas, O., Melo, A., Pinho, O. y Ferreira, I.M.P.L.V.O (2010). Effect of green tea marinades on the formation of heterocyclic aromatic amines and sensory quality of pan-fried beef, *Food Chem.* 122, 98-104.
124. Quintero Salazar, B. (2001). Empleo de cultivos bioprotectores y nisina sobre la calidad microbiológica y fisicoquímica de carne de pollo almacenada en condiciones de abuso de temperatura. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México. 38-54
125. Reis, J.A., Paula, A.T., Casarotti, S.N. y Penna, A.L.B. (2012). Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds and Applications, *Food Eng. Rev.* 4, 124-140.
126. Rodgers, S. Kailasapathy, K. Cox. J. y Peiris, P. (2002). Bacteriocin production by protective cultures. *Food Serv. Tech.* 2, 59-68.
127. Rubio, R. Aymerich, T., Bover-Cid, S., Dolors Guardia, M., Arnau, J. y Garriga, M. (2013). Probiotic strains *Lactobacillus plantarum* 299 V and *Lactobacillus rhamnosus* GG as starter cultures for fermented sausages. *LWT-Food Sci. Technol.* 54, 51-56.
128. Rubio, R., Martín, B., Aymerich, T. y Garriga, M. (2014). The potential probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CTC 1679 survives the passage through the gastrointestinal tract and its use as starter culture results in safe nutritionally enhanced fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 186, 55-60.

129. Ruíz Martínez, Daniel, E. y Pacheco-Delahaye, E. (2007). Utilización de Inulina y Carragenina en la elaboración de salchichas de carne bajas en grasa, *Rev. Fac. Agron.* 33,165-178.
130. Ruíz-Larrea, F., Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Navarro, L., Díez, L., Zarazaga, M. y Torres, C. (2007). Bacteriocinas para la estabilización microbiológica y reducción de la dosis de SO₂. *International Symposium Microbiology and Food Safety of Wine*, 20-21.
131. Rousseau, B., Ennis, D.M. and, Rossi, F. (2012). Internal preference mapping and the issue of satiety. *Food Quality and Preference* 24,67-74.
132. Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J.M. y Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT-Food Sci. Technol.* 50,1-16.
133. San Martín-González, M.F. (2015). En Curso Taller: Prediciendo y Controlando la vida de anaquel en Alimentos, 29-30 de enero del 2015, Guadalajara, Jalisco, México. Food Safety International Network.
134. Schirmer, B.C., Heir, E., y Langsrud, S. (2009). Characterization of the bacterial spoilage flora in marinated pork products, *J. Appl. Microbiol.* 106, 2106-2116.
135. Sebastián, C. C., Soriano, J. M., Iranzo, M. M., y Rico, H. H. (2010). Microbiological Quality of *Sous Vide* Cook-Chill Preserved Food At Different Shelf Life, *J. Food Process. Preserv.* 34, 964-974.
136. Sezer, C. y Güven, A. (2009). Investigation of bacteriocin production capability of lactic acid bacteria isolated from food. *The Journal of the Faculty of Veterinary Medicine* 15, 45-50.
137. Shah, N.P. (2010). Capítulo 26: Probiotics: Health Benefits, Efficacy and Safety, En: *Biotechnology in Functional Foods and Nutraceuticals*. Ed. por: Bagchi, D, Lau, F., y Ghosh, D.K., CRC Press, EUA, 485- 494.
138. Sheard, P.R., Hughes, S.I. and, Jaspal, M.H. (2012). Color, pH and weight changes of PSE, normal and DFD breast fillets from British broilers treated with a phosphate-free, low salt marinade, *Brit. Poult. Sci.* 53,57-65.

139. Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B. y Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance- a review, *Appetite* 51,456-467.
140. Singh, R., Banerjee, J. y Arora, A. (2015). Prebiotic potential of oligosaccharides: A focus on xylan derived oligosaccharides, *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 5, 19-30.
141. Snyder, A. B., y Worobo, R. W. (2014). Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety, *J. Sci. Food Agr* 94, 28-44.
142. Sridevi, V., Sumathi, V., Guru Prasad, M. y Kumar, S.M. (2014). Fructooligosaccharides-type prebiotic: a review, *J. Pharm. Res.* 8, 321-330.
143. Sun, X.D. (2009). Utilization of restructuring technology in the production of meat products: a review, *CyTA – J. Food* 7, 153-162.
144. Sun, X.D. y Holley R.A. (2012). Antimicrobial and Antioxidative Strategies to Reduce Pathogens and Extend the Shelf Life of Fresh Red Meats, *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.* 11, 340-354.
145. Suskovic, J., Kos, B., Beganovic, J., Pavunc, A.L, Habjanic, K. y Matosic, S. (2010). Antimicrobial Activity- The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria, *Food Technol. Biotechnol.* 48, 296-307.
146. Szczesniak, A.S., Brandt, M.A. y Riedman, H.H. (1963). Development of standard rating scales for mechanical parameters of texture and evaluation, *J. Food Sci.* 28, 397-403.
147. Taoukis, P. S., Labuza, T. P., y Saguy, I. S. (1997). 9 Kinetics of Food Deterioration and Shelf-Life Prediction. En: *Handbook of Food Engineering Practice*. CRC Press, Ed. Valentas, K.J., Rotstein, E. y Singh, R.P. EUA, 361-403.
148. Thévenot, D., Dernburg, A. y Vernozy-Rozand (2006). An updated review of *Listeria monocytogenes* in pork meat industry and its products, *J. Appl. Microbiol.* 101,7-17.
149. Valdés Martínez, S.E. (2006). Hidratos de Carbono. En: *Química de Alimentos* (4ª edición) Ed. por: Badui, S. Pearson-Addison Wesley, México. 29-109.

150. Verbeke, W. (2006). Functional foods: consumer willingness to compromise on taste for health? *Food Qual. Prefer.* 17, 126-131.
151. Venegas, O. y Pérez, D. (2009). Determinación de rancidez en carne, *Ciencia y Tecnología De Los Alimentos*, 19, 60-70.
152. Wang, W. y Wang, H. (2014). The effect of lactic acid bacteria in food and feed and their impact on food safety, *Int. J. Food Eng.* 10, 203-210.
153. Zhang, H., Wu, J. y Guo, X. (2016). Effects of antimicrobial and antioxidant activities of spice extracts on raw meat quality, *Food Sci. Hum. Wellness* 5, 39-48.
154. Zhu, M., Du, M., Cordray, J. y Uk Ahn, D. (2005). Control of *Listeria monocytogenes* contamination in ready-to-eat meat products, *Rev. Food Sci. Food Saf.* 4, 34-42.

Sitiografía

1. Basangov, A.. (2013). Modelo CIEL lab. Consultado el 27 de febrero del 2017. Sitio web: <http://aldarbasangov.blogspot.mx/2013/11/uf-3-ajust-dimensional-intonal-de-les.html>
2. Diario Oficial de la Federación [DOF] (2002). Norma Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2002, PRODUCTOS Y SERVICIOS, PRODUCTOS CARNICOS PROCESADOS. Consultado el 13 de noviembre de 2013, de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/213ssa102.html>.
3. Dof.gom.mx (05/04/2010) NORMA Oficial Mexicana NOM-051-SCFI/SSA1-2010, Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas y pre envasados- Información comercial y sanitaria. Consultado el 13 de abril de 2014, de http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5137518&fecha=05/04/2010.
4. FAO [Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura] Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor. Producción y Sanidad Animal. Carne y Productos Cárnicos. Consultado de, <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/home.html>.
5. FAO (2006). Estudio FAO Alimentación y Nutrición. Probióticos en los alimentos: Propiedades saludables y nutricionales. Directrices para su evaluación. <http://www.fao.org/3/a-a0512s.pdf>. Consultado el 7 de mayo del 2017.
6. Financiera Rural (junio 2012). Monografía de Ganado Porcino. Consultado el 22 de marzo del 2015. [http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADaPorcinos\(jun2012\).pdf](http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADaPorcinos(jun2012).pdf)
7. Financiera Rural (Mayo 2014). Panorama del Porcino. Consultado el 1 de febrero del 2017, de: <http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Ficha%20Porcino.pdf>

8. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI). Sistema de Información de la Gaceta de la Propiedad Industrial. Consultado el 13 de noviembre de 2013, de, [http://siga.impi.gob.mx/
#busquedas#operator=all#search=#gaceta=3#resultados=25#skip=0#order=fecha
Publicacion](http://siga.impi.gob.mx/#busquedas#operator=all#search=#gaceta=3#resultados=25#skip=0#order=fechaPublicacion)
9. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). ENIGH (Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos de los Hogares). Consultado el 5 de septiembre del 2016, de http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/boletines/2015/especiales/especiales2015_07_3.pdf
10. Porkandhealth.org (2014 a). Vitamins and Minerals in Pork. Consultado el 17 de Julio del 2014, de http://porkandhealth.org/Cms/FactsAboutPork_VitaminsAndMineralsInPork.
11. Porkandhealth.org (2014 b). Profile on pork: nutritious and delicious. Consultado el 17 de Julio del 2014, de http://porkandhealth.org/filelibrary/PorkAndHealth/freebies_PROFILE%20ON%20PORK%202012%2010%2004.pdf
12. Vásquez, S. Suárez, H. y Zapata, S. (2009) Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. Consultado el 18 de octubre de 2013, de <http://www.scielo.cl/pdf/rchnut/v36n1/art07.pdf>.

Anexo. A. Fichas técnicas de prebióticos utilizados

Ingrediente/ Aditivo comercial	PRODUCTOR	DESCRIPCIÓN	CARACTERÍSTICAS	FUNCIONALIDAD
Fibra dietética PROMITOR	Tate&Lyle	<p>Fibra soluble de maíz prebiótica, baja respuesta glucémica, soluble en agua, 2Kcal /g, estabilidad ácida, brinda textura y cuerpo. GRAS por la FDA.</p> <p>Oligosacárido de glucosa, obtenido por hidrólisis mediante enzimas, seguido de una evaporación controlada y purificación. Obteniendo un grado de polimerización de 10 DP (por sus siglas en inglés) y 20 DE (dextrosa equivalente por sus siglas en inglés). La ramificación de algunos enlaces α 1-2 y α 1-3 confiere a la fibra una resistencia a la digestión en el intestino delgado.</p>	<p>5-6 % de humedad; Polvo seco; poco higroscópico; vida de anaquel de 24 meses. Resistencia a temperaturas de pasteurización y pH de 3.5 – 5.5 (yogurt) incluso por periodos de 12 meses; alto contenido de fibra dietética (>70%); altamente soluble min. 85%</p>	<p>La fibra soluble de maíz PROMITOR™ estimula la producción de ácidos grasos de cadena corta que están asociados con la salud del colon. También minimiza la generación de productos de fermentación perjudiciales en el colon, tales como el amoníaco y los ácidos grasos de cadena ramificada. Estimula el crecimiento de bacterias beneficiosas en el intestino grueso, al mismo tiempo que minimiza el crecimiento de bacterias indeseables.</p>
Inulina de achicoria enriquecida (SYNERGY 1)	BENEIO	<p>Inulina de achicoria en polvo enriquecida con una fracción de oligofruktosa producida por una hidrólisis enzimática parcial de la inulina de achicoria, resultando en moléculas con una longitud de cadena seleccionada cuidadosamente (grado de polimerización). La inulina de achicoria consiste</p>	<p>Polvo fino, blanco-amarillo pálido. Higroscópico. Ligeramente dulce. Soluble 5% a temperatura ambiente. Vida de anaquel de 3 años. DP3-9 : (50±10) % DP≥ : (50±10) % Densidad: (600 +/- 50) g/l</p>	<p>Utilizado como ingrediente para alimentos procesados, consiste de inulina, oligofruktosa, glucosa y sacarosa. La ingesta diaria de 8g aumenta significativamente la absorción de calcio.</p>

		<p>en polisacáridos compuestos de fructuosa unidos con un enlace β (2-1), terminando cada molécula con una unidad de glucosa, teniendo en total de 2 a 60 unidades de fructuosa/ glucosa. La enriquecida en un grado de polimerización entre 2 y 8.</p>		
--	--	--	--	--

Anexo. B. Resultados estadísticos de las pruebas sensoriales relacionados con la evaluación de las formulaciones mediante la técnica de justamente Correcto.

Tabla 29. Análisis estadístico de segmentación realizado entre los distintos rangos de edades de la población estudiada.

A fin de determinar si existía diferencias estadísticas entre grupos evaluadas por medio de la prueba estadística de χ^2 $\alpha \leq 0.05$

Tratamientos donde se observan diferencias significativas $\alpha \leq 0.05$	Tratamientos donde no se observan diferencias significativas $\alpha \leq 0.05$
Donde: Y1= 18-26; Y2=27-34; X1=35-42; X2=43-50; B1=51-58; B2=59-66	
<p><i>: B1, B2</i> χ^2 value = 13.624738 P value = 0.001100</p> <p><i>B1, X1</i> χ^2 value = 29.582792 P value = 0.000000</p> <p><i>B1, X2</i> χ^2 value = 24.758641 P value = 0.000004</p> <p><i>B1, Y1</i> χ^2 value = 121.957277 P value = 0.000000</p> <p><i>B1, Y2</i> χ^2 value = 40.622514 P value = 0.000000</p> <p><i>B2, Y1</i> χ^2 value = 21.504058 P value = 0.000021</p> <p><i>X1, Y1</i> χ^2 value = 22.145865 P value = 0.000016</p> <p><i>X1, Y2</i> χ^2 value = 7.071411 P value = 0.029138</p> <p><i>X2, Y1</i> χ^2 value = 7.698349 P value = 0.021297</p>	<p><i>X2, Y2</i> χ^2 value = 1.173623 P value = 0.556098</p> <p><i>Y1, Y2</i> χ^2 value = 9.551440 P value = 0.008432</p> <p><i>B2, X1</i> χ^2 value = 4.303277 P value = 0.116293</p> <p><i>B2, X2</i> χ^2 value = 2.327147 P value = 0.312368</p> <p><i>B2, Y2</i> χ^2 value = 3.820117 P value = 0.148072</p> <p><i>X1, X2</i> χ^2 value = 1.193740</p>

Ho: No existe diferencia en los segmentos de edades de las personas sobre la apreciación del “gusto” de los prototipos de marinadas analizados

Tabla 30. Promedio y desviación estándar llevadas a cabo en pruebas de Justamente correcto para seleccionar el prototipo ideal a partir de cinco distintas formulaciones.

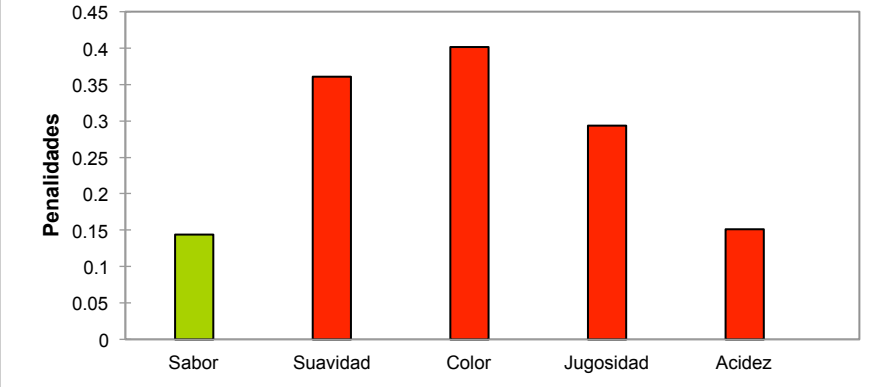
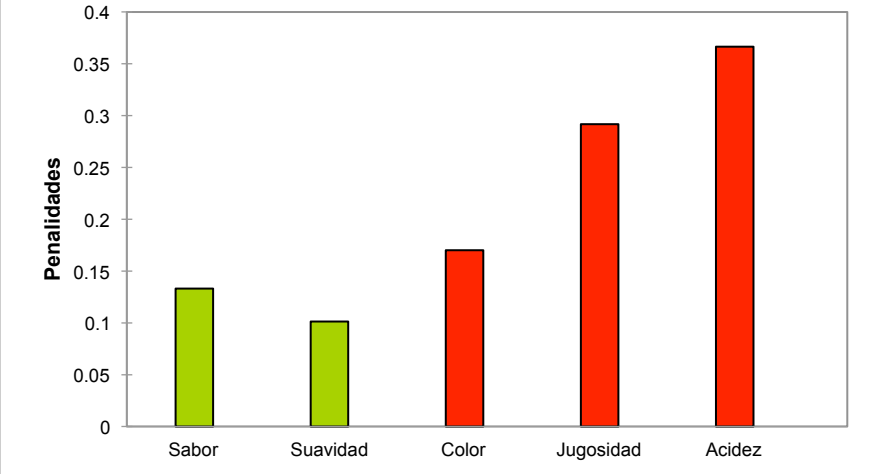
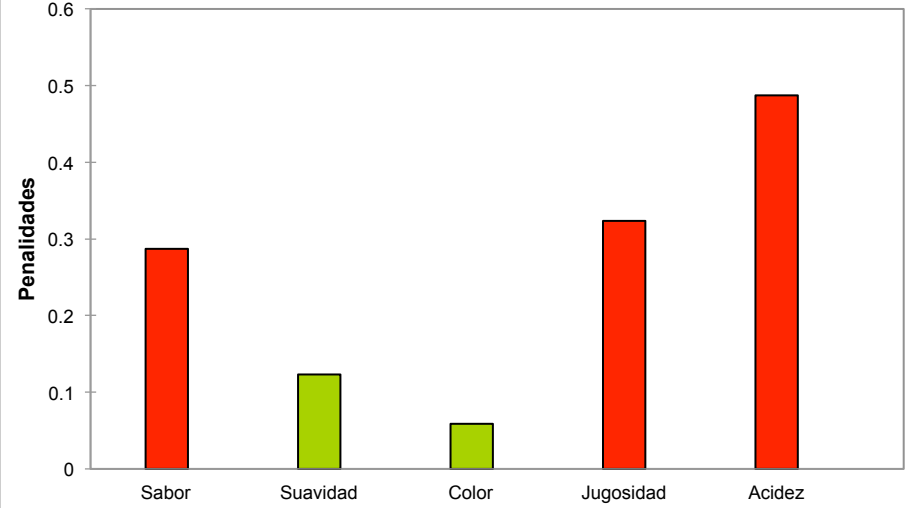
Muestra	Estadística Descriptiva		
	Variable	Media	Desviación típica
AF1	Aceptabilidad Ponderada	2.405	0.530
	Sabor	2.888	1.054
	Suavid	3.512	0.973
	Color	2.620	0.673
	Jugosidad	2.854	0.550
	Acidez	3.146	0.791
	AF2	Variable	Media
Aceptabilidad Ponderada		2.488	0.548
Sabor		3.156	0.931
Suavidad		3.405	0.739
Color		2.683	0.680
Jugosidad		2.961	0.640
Acidez		3.034	0.652
AF3	Variable	Media	Desviación típica
	Aceptabilidad Ponderada	2.583	0.514
	Sabor	3.127	0.906
	Suavidad	3.181	0.605
	Color	2.760	0.592
	Jugosidad	2.922	0.623
	Acidez	3.044	0.653
AF4	Variable	Media	Desviación típica
	Aceptabilidad Ponderada	2.137	0.665
	Sabor	3.161	1.167
	Suavidad	3.556	0.941

	Color	2.595	0.790
	Jugosidad	2.741	0.712
	Acidez	3.312	0.924
AF5	Variable	Media	Desviación típica
	Aceptabilidad Ponderada	2.537	0.564
	Sabor	3.078	0.977
	Suavidad	3.302	0.718
	Color	2.737	0.625
	Jugosidad	2.932	0.607
	Acidez	3.200	0.674

Tabla 31. Matriz de correlación de spearman usada para seleccionar el prototipo a partir de cinco distintas distintas formulaciones.

Muestra	Matriz de correlación (Spearman)						
AF1	Matriz de correlación (Spearman):						
	Variables	Aceptabilidad Ponderada	Sabor	Suavidad	Color	Jugosidad	Acidez
	Aceptabilidad Ponderada	1	0.174	-0.282	0.295	0.081	-0.13
	Sabor	-0.174	1	0.456	-0.159	-0.114	0.14
	Suavidad	-0.282	0.456	1	-0.280	0.138	0.22
	Color	0.295	0.159	-0.280	1	0.222	0.05
	Jugosidad	0.081	0.114	0.138	0.222	1	0.21
	Acidez	-0.133	0.143	0.228	0.050	0.216	
<i>Los valores en negrita son diferentes de 0 con un nivel de significación alfa=0,05</i>							
AF2	Matriz de correlación (Spearman):						
	Variables	Aceptabilidad Ponderada	Sabor	Suavidad	Color	Jugosidad	
	Aceptabilidad Ponderada	1	0.169	-0.062	0.023	-0.032	
	Sabor	-0.169	1	0.489	-0.060	0.048	
	Suavidad	-0.062	0.489	1	-0.082	0.070	
	Color	0.023	0.060	-0.082	1	0.352	
	Jugosidad	-0.032	0.048	0.070	0.352	1	
	Acidez	-0.111	0.255	0.198	0.262	0.358	
<i>Los valores en negrita son diferentes de 0 con un nivel de significación alfa=0,05</i>							
AF3	Variables	Aceptabilidad Ponderada	Sabor	Suavidad	Color	Jugosidad	Acidez
	Aceptabilidad Ponderada	1	0.182	-0.066	-0.105	-0.162	0.01
	Sabor	0.182	1	0.317	-0.178	-0.045	0.15
	Suavidad	-0.066	0.317	1	-0.005	0.193	-0.05

	Color	-0.105	-0.178	-0.005	1	0.307	0.03
	Jugosidad	-0.162	-0.045	0.193	0.307	1	-0.05
	Acidez	0.015	0.152	-0.056	0.036	-0.054	
<i>Los valores en negrita son diferentes de 0 con un nivel de significación alfa=0,05</i>							
AF4	Variables	Acceptabilidad Ponderada	Sabor	Suavidad	Color	Jugosidad	Acidez
	Acceptabilidad Ponderada	1	-0.213	-0.306	0.287	0.301	-0.15
	Sabor	-0.213	1	0.534	-0.011	0.019	0.26
	Suavidad	-0.306	0.534	1	-0.141	-0.100	0.21
	Color	0.287	-0.011	-0.141	1	0.427	0.18
	Jugosidad	0.301	0.019	-0.100	0.427	1	0.26
	Acidez	-0.151	0.263	0.216	0.181	0.266	
	<i>Los valores en negrita son diferentes de 0 con un nivel de significación alfa=0,05</i>						
AF5	Variables	Acceptabilidad Ponderada	Sabor	Suavidad	Color	Jugosidad	Acidez
	Acceptabilidad Ponderada	1	0.064	-0.088	0.159	-0.009	-0.23
	Sabor	0.064	1	0.321	-0.041	-0.045	0.09
	Suavidad	-0.088	0.321	1	-0.081	0.026	0.03
	Color	0.159	-0.041	-0.081	1	0.485	0.07
	Jugosidad	-0.009	-0.045	0.026	0.485	1	0.24
	Acidez	-0.236	0.098	0.035	0.070	0.247	
	<i>Los valores en negrita son diferentes de 0 con un nivel de significación alfa=0,05</i>						

Muestra													
AF1	 <table border="1"> <caption>Penalidades for Muestra AF1</caption> <thead> <tr> <th>Categoría</th> <th>Penalidades</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sabor</td> <td>0.15</td> </tr> <tr> <td>Suavidad</td> <td>0.36</td> </tr> <tr> <td>Color</td> <td>0.40</td> </tr> <tr> <td>Jugosidad</td> <td>0.29</td> </tr> <tr> <td>Acidez</td> <td>0.15</td> </tr> </tbody> </table>	Categoría	Penalidades	Sabor	0.15	Suavidad	0.36	Color	0.40	Jugosidad	0.29	Acidez	0.15
Categoría	Penalidades												
Sabor	0.15												
Suavidad	0.36												
Color	0.40												
Jugosidad	0.29												
Acidez	0.15												
AF2	 <table border="1"> <caption>Penalidades for Muestra AF2</caption> <thead> <tr> <th>Categoría</th> <th>Penalidades</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sabor</td> <td>0.13</td> </tr> <tr> <td>Suavidad</td> <td>0.10</td> </tr> <tr> <td>Color</td> <td>0.17</td> </tr> <tr> <td>Jugosidad</td> <td>0.29</td> </tr> <tr> <td>Acidez</td> <td>0.37</td> </tr> </tbody> </table>	Categoría	Penalidades	Sabor	0.13	Suavidad	0.10	Color	0.17	Jugosidad	0.29	Acidez	0.37
Categoría	Penalidades												
Sabor	0.13												
Suavidad	0.10												
Color	0.17												
Jugosidad	0.29												
Acidez	0.37												
AF3	<p style="text-align: center;">Penalidades</p>  <table border="1"> <caption>Penalidades for Muestra AF3</caption> <thead> <tr> <th>Categoría</th> <th>Penalidades</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sabor</td> <td>0.29</td> </tr> <tr> <td>Suavidad</td> <td>0.12</td> </tr> <tr> <td>Color</td> <td>0.06</td> </tr> <tr> <td>Jugosidad</td> <td>0.32</td> </tr> <tr> <td>Acidez</td> <td>0.49</td> </tr> </tbody> </table>	Categoría	Penalidades	Sabor	0.29	Suavidad	0.12	Color	0.06	Jugosidad	0.32	Acidez	0.49
Categoría	Penalidades												
Sabor	0.29												
Suavidad	0.12												
Color	0.06												
Jugosidad	0.32												
Acidez	0.49												

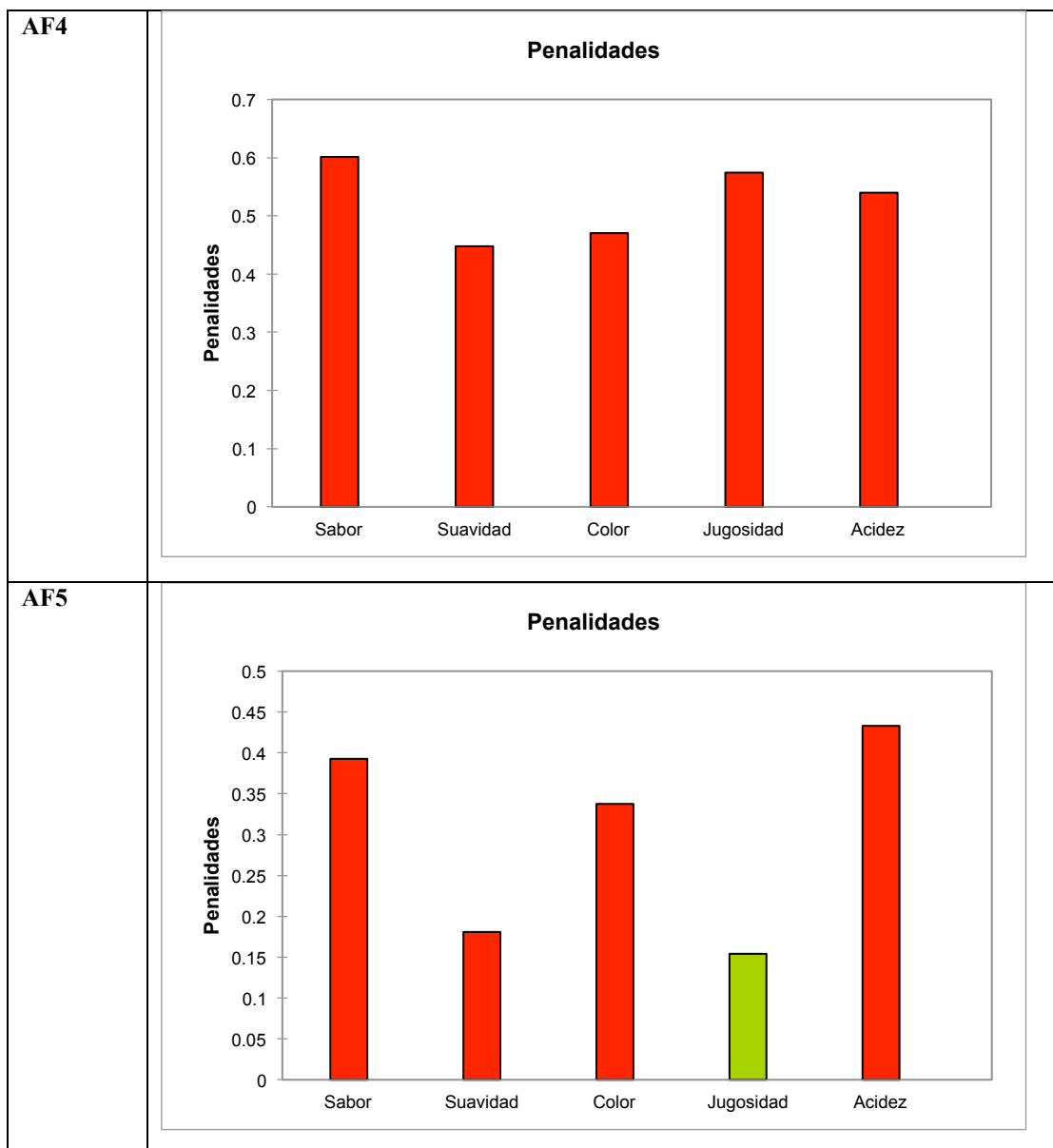


Figura 46. Análisis de Penalidades utilizado para seleccionar el prototipo a partir de distintas formulaciones.

Tabla 32. Prueba de t entre formulaciones evaluadas.

TRATAMIENTO	ESTADISTICO DE PRUEBA	VALOR p y DECISIÓN SI SE ACEPTA HO O HA	INTERVALOS DE CONFIANZA, LIMITE SUPERIOR INFERIOR	DE SUPERIOR E	MEDIA
AF1	t = -8.1551, df = 215,	p-value = 2.882e-14 HA	2.522866	2.708615	2.615741

		alternative hypothesis: true mean is not equal to 3			
AF2	t = -2.6736, df = 215	p-value = 0.00808 alternative hypothesis: true mean is not equal to 3	2.766762	2.964720	2.865741
AF3	t = -2.7516, df = 215	p-value = 0.006436 alternative hypothesis: true mean is not equal to 3	2.793405	2.965854	2.87963
AF4	t = -7.0265, df = 215,	p-value = 2.756e-11 alternative hypothesis: true mean is not equal to 3	2.389383	2.656913	2.523148
AF5	t = -3.7448, df = 215,	p-value = 0.0002318 alternative hypothesis: true mean is not equal to 3	2.724410	2.914479	2.819444

Tabla 33. Prueba de ANOVA para evaluar diferencias entre formulaciones.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Muestra	4	22.49	5.6216	9.587	1.282e-07 ***
Residuals	1079	632.70	0.5864		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Ahora bien al comparar las medias de cada una de los tratamientos mediante la prueba de ANOVA, se puede observar que existen diferencias significativas entre muestras ($\alpha \leq 0.05$), por lo cual se descarta la hipótesis nula, que nos indica que al menos un tratamiento difiere.

Se procedió a realizar una prueba de t, observándose que existe diferencia significativa, con un intervalo de confianza del 95%, entre los siguientes tratamientos.

AF1 Y AF2;
 AF1 Y AF3;
 AF1 Y AF5.
 AF2 y AF4
 AF3 Y AF4
 AF4 Y AF5

Se observó de acuerdo a esta prueba estadística que los tratamientos que no presentan estas diferencias significativas son:

AF1 Y AF4
 AF2 Y AF3
 AF2 Y AF5
 AF3 Y AF5

Lo anterior nos indica que, la muestra AF3 (Inulina + Marinador) y AF2(Marinador) son las preferidas.

AF3 Inulina + Marinador ($\mu=2.87$) >

AF2 Marinador ($\mu=2.86$) >

AF5 Promitor + Marinador ($\mu=2.81$) >

AF1 Control ($\mu=2.61$) >

AF4 Nopal + Marinador ($\mu=2.52$).

Tabla 34. Prueba de t comparación entre tratamientos.

COMPARACIÓN DE TRATAMIENTOS	ESTADISTICO DE PRUEBA	VALOR DE P Y TOMA DE DECISIÓN	INTERVALOS	DIFERENCIA DE MEDIAS
AF1 –AF2	t = -3.9663 df = 215	p-value = 9.942e-05 alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0	-0.3742372 -0.1257628	-0.25
AF1-AF3	t = -4.6132, df = 215,	p-value = 6.808e-06 alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0	-0.3766387 -0.1511391	-0.2638889
AF1-AF4	t = 1.2371, df = 215,	p-value = 0.2174 alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0	-0.05493183 0.24011701	0.09259259
AF1-AF5	t = -3.3371, df = 215,	p-value = 0.0009973 alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0	-0.32401962 0.08338779	-0.2037037
AF2-AF3	t = -0.2503, df = 215	p-value = 0.8026 alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0	-0.12324883 0.09547106	-0.01388889
AF2-AF4	t = 4.5383, df = 215,	p-value = 9.434e-06 alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0	0.1937977 0.4913875	0.3425926
AF2-AF5	t = 0.7488, df = 215	p-value = 0.4548 alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0	-0.07557405 0.16816664	0.0462963
AF3-AF4	t = 5.138, df = 215,	p-value = 6.221e-07 alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0	0.2197269 0.4932360	0.3564815

AF3-AF5	t = 1.1113, df = 215	p-value = 0.2677 alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0	-0.04656537 0.16693574	0.06018519
AF4-AF5	t = -4.1649, df = 215	p-value = 4.51e-05 alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0	-0.4365201 -0.1560725	-0.2962963

Tabla 35. Prueba de Tukey para establecer diferencias entre formulaciones.

	diff	lwr	upr	p adj
AF2-AF1	0.24884793	0.047976416	0.4497194	0.0066056
AF3-AF1	0.26211811	0.061014242	0.4632220	0.0035288
AF4-AF1	-0.09216590	-0.293037409	0.1087056	0.7196426
AF5-AF1	0.20737327	0.006501761	0.4082448	0.0390924
AF3-AF2	0.01327018	-0.187833684	0.2143740	0.9997637
AF4-AF2	-0.34101382	-0.541885336	-0.1401423	0.0000387
AF5-AF2	-0.04147465	-0.242346165	0.1593969	0.9801553
AF4-AF3	-0.35428401	-0.555387874	-0.1531801	0.0000167
AF5-AF3	-0.05474484	-0.255848703	0.1463590	0.9460950
AF5-AF4	0.29953917	0.098667660	0.5004107	0.0004744