



Estudio del efecto bioconservante de distintas bacterias ácido lácticas en productos cárnicos crudos.

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología

Autores: Gualán Pérez, Jefferson Michael y Plua Alvear, Oswaldo Enrique

Tutora: Sánchez Llaguno, Sungey Naynee PhD.

Santo Domingo, Ecuador
2023

INTRODUCCIÓN

El paiche o pirarucú (*Arapaima gigas*)

- Habita en la región amazónica de América latina.
- Es aprovechado en diferentes países como Brasil, Perú, Colombia, Venezuela, Bolivia y Ecuador.
- Es una especie muy apetecida por las masas debido al costo elevado de su carne.

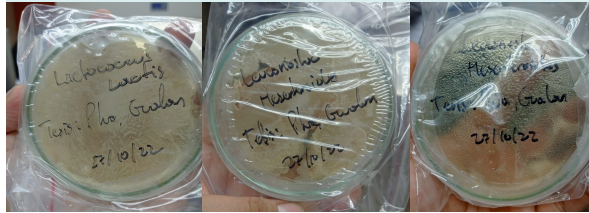


Las BAL

El uso de cepas bacterianas del género *Lactobacillus* producen “bacteriocinas”, sustancias con capacidad antimicrobiana

Entre las especies de BAL más destacadas tenemos:

- *Lactobacillus plantarum*
- *Lactococcus lactis*
- *Lactobacillus casei*
- *Lactobacillus hilgardii*
- *Pediococcus damnosus*
- *Leuconostoc mesenteroides*



Aditivos Químicos

Nitritos y nitratos han sido utilizados para evitar la oxidación lipídica, realzar y fijar el color y el sabor de la carne.

Se han relacionado los nitritos con procesos cancerígenos al producir nitrosaminas. Estas últimas se estima que cerca del 85% son cancerígenas.



OBJETIVOS

Objetivo General

- ❑ Estudiar el efecto bioconservante de distintas bacterias ácido lácticas en productos cárnicos crudos a partir de *Arapaima gigas* (paiche).

Objetivos Específicos

- ❑ Estudiar dos tipos de productos cárnicos crudos de *Arapaima gigas* (mojama y hamburguesa), mediante la aplicación de bacterias ácido lácticas como bioconservante.
- ❑ Evaluar el efecto bioconservante de tres bacterias ácido lácticas: *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* y *Leuconostoc mesenteroides* en la elaboración de productos a partir de *Arapaima gigas*.
- ❑ Determinar la concentración óptima de bioconservante en la elaboración de productos elaborados de *Arapaima gigas* (mojama y hamburguesa).
- ❑ Analizar el efecto de las bacterias Ácido lácticas como bioconservantes mediante análisis microbiológicos en los productos cárnicos de *Arapaima gigas*.

HIPÓTESIS

Factor A

Ho: Los productos cárnicos crudos del paiche no influyen en la bioconservación del paiche.

Ha: Los productos cárnicos crudos del paiche influyen en la bioconservación del paiche.

Factor B

Ho: Las distintas bacterias ácido lácticas no influyen en la bioconservación de productos cárnicos crudos a partir del paiche.

Ha: Las distintas bacterias ácido lácticas influyen en la bioconservación de productos cárnicos crudos a partir del paiche.

HIPÓTESIS

Factor C

H₀: Las concentraciones de los bioconservantes no influyen en la bioconservación de productos cárnicos crudos a partir del paiche.

H_a: Las concentraciones de los bioconservantes influyen en la bioconservación de productos cárnicos crudos a partir del paiche.

Interacción A*B*C

H₀: El efecto de las interacciones entre los factores producto de paiche, bacterias y concentración del bioconservante no influye en la bioconservación con bacterias ácido lácticas.

H_a: El efecto de las interacciones entre los factores producto de paiche, bacterias y concentración del bioconservante influye en la bioconservación con bacterias ácido lácticas.

METODOLOGÍA

Ubicación política

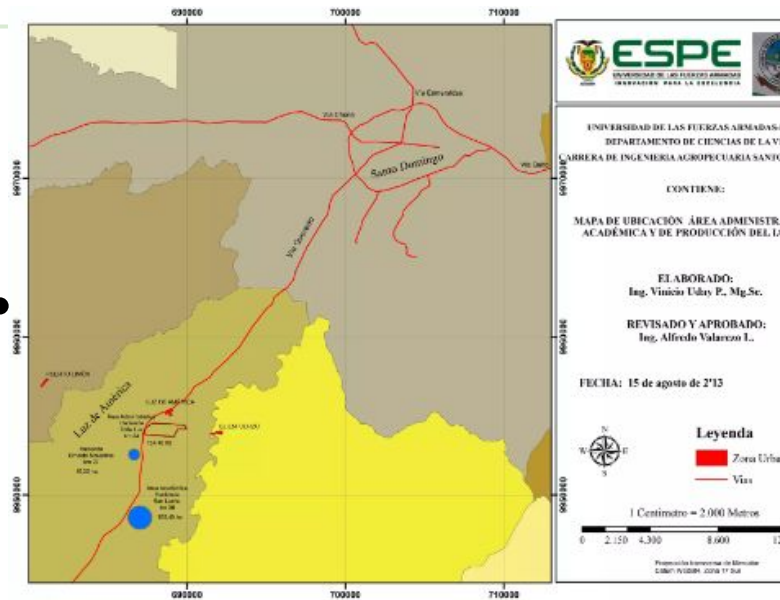
País: Ecuador

Provincia: Santo Domingo de los Tsáchilas

Cantón: Santo Domingo

Parroquia: Luz de América

Sector: Km. 24 vía Santo Domingo-Quevedo



Ubicación ecológica

Temperatura:	24°C	Precipitación:	2860 mm/año
Altitud:	224 msnm	Humedad relativa:	85 %
Zona de vida	Bosque húmedo tropical	Suelos:	Francos arenosos

METODOLOGÍA

Obtención de BAL

Donadas

Fueron donadas por los Ingenieros:

- Jairo Cueva (*Lactobacillus plantarum*)-fermentación de Café arábico y café robusto
- Jean Muñoz (*Lactococcus lactis*)-Fermentación de Quinoa roja
- Nathaly Mora y Diana Rosero (*Leuconostoc mesenteroides*)-mosto de tuna.

Preparación de las muestras

Mojama de paiche



1. Los filetes de pescado se dejaron en refrigeración a 3 °C cubiertos totalmente de sal gruesa durante 24 h.
2. Se realizó un lavado con agua.
3. Se roció a los filetes con las soluciones de bacteriocinas y se dejó reposar durante 15 días.

Carne de hamburgueses



1. En el cutter para embutido se mezclaron los siguientes ingredientes: carne de paiche, tocino de cerdo, proteína XT 202, condimento de hamburguesa, sal, hielo, ralladura de pan, nitral, humo líquido, almidón de yuca, cebolla en rama y ajo en polvo.
2. Refrigero durante los siguientes 7 días.

METODOLOGÍA

Preparación de solución bioconservante

Esterilización y preparación del medio

Se preparó el medio líquido MRS Agar broth



Inoculación e incubación

Se inoculó las BAL en el caldo y se incubó a 37 °C durante 24 h.



Recuperación bacteriana

Se centrifugó a 10000 rpm durante 15 min. de 2 a 3 veces. Se resuspendieron las bacterias en buffer ácido cítrico-citrato de sodio.

Se hizo dos concentraciones de bioconservante mediante datos de absorbancia



METODOLOGÍA

Análisis de variables fisicoquímicas

pH

NORMA INEN 389



acidez

NORMA INEN 381

Con una titulación con NaOH 0,1 N

$$A = \frac{V_1 N_1 M}{V_2}$$

humedad

20 gr de la muestra en la estufa a 130°C durante 2 h.

$$\%H = \frac{W_2 - W_1}{W_0} * 100$$

ceniza

20 g de la muestra quemada, en la mufla a 600°C por 3 h.

$$\% C = \frac{W_2 - W_1}{W_0} * 100$$

Proteína

Equipo de extracción kjeldahl (2g)

$$\% PB = \frac{(VHCL - VB) * 1,401 * NHCL * F}{g muestra} * 100$$

Grasa

Extractor de grasas (2g)



METODOLOGÍA

Análisis microbiológico

Esterilización y preparación del medio

Se esterilizó la cámara y se utilizó tubos de rosca con Agua de peptona con 27 mL y 9 mL.



Diluciones seriadas

Se trituró la muestra y se realizaron diluciones hasta 10^{-5} de la muestra.



Siembra en petrifilm

Se sembró en petrifilm de aerobios, mohos y levaduras.



METODOLOGÍA

Factores y niveles de experimentación

Factores	Simbología y niveles
Tipo de producto (A)	a0: Mojama a1: Carne de hamburguesa
Tipo de bacteria (B)	b0: <i>Lactobacillus plantarum</i> b1: <i>Lactococcus lactis</i> b2: <i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Concentración (C)	c0: 3×10^{-7} c1: 5×10^{-7}

Diseño Experimental

Tipo de diseño

Se aplicó un ANOVA DBCA (Diseño de bloques completos al azar) con un arreglo factorial A*B*C (2x3x2)

Repeticiones

Se realizó con 3 réplicas por cada tratamiento, teniendo un total de 36 unidades experimentales.

METODOLOGÍA

Diseño Experimental

N°	Interacciones	Unidades
T1	$a_0 b_0 c_0$	Mojama + <i>Lactobacillus plantarum</i> + 3×10^{-7} UFC/ml
T2	$a_0 b_0 c_1$	Mojama + <i>Lactobacillus plantarum</i> + 5×10^{-7} UFC/ml
T3	$a_0 b_1 c_0$	Mojama + <i>Lactococcus lactis</i> + 3×10^{-7} UFC/ml
T4	$a_0 b_1 c_1$	Mojama + <i>Lactococcus lactis</i> + 5×10^{-7} UFC/ml
T5	$a_0 b_2 c_0$	Mojama + <i>Leuconostoc mesenteroides</i> + 3×10^{-7} UFC/ml
T6	$a_0 b_2 c_1$	Mojama + <i>Leuconostoc mesenteroides</i> + 5×10^{-7} UFC/ml
T7	$a_1 b_0 c_0$	Carne de hamburguesa + <i>Lactobacillus plantarum</i> + 3×10^{-7} UFC/ml
T8	$a_1 b_0 c_1$	Carne de hamburguesa + <i>Lactobacillus plantarum</i> + 5×10^{-7} UFC/ml
T9	$a_1 b_1 c_0$	Carne de hamburguesa + <i>Lactococcus lactis</i> + 3×10^{-7} UFC/ml
T10	$a_1 b_1 c_1$	Carne de hamburguesa + <i>Lactococcus lactis</i> + 5×10^{-7} UFC/ml
T11	$a_1 b_2 c_0$	Carne de hamburguesa + <i>Leuconostoc mesenteroides</i> + 3×10^{-7} UFC/ml
T12	$a_1 b_2 c_1$	Carne de hamburguesa + <i>Leuconostoc mesenteroides</i> + 5×10^{-7} UFC/ml

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

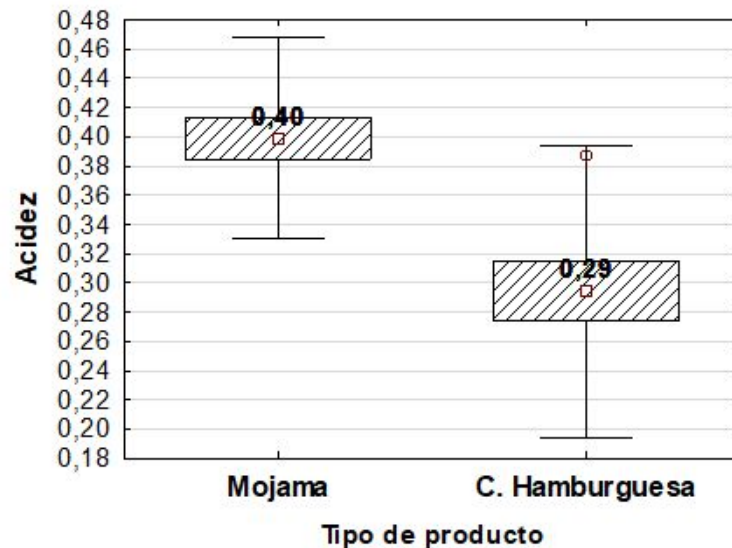
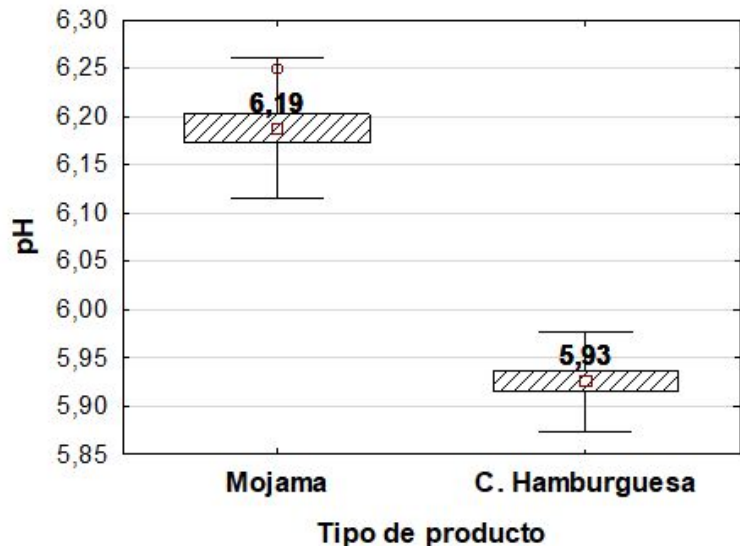
ANOVA $p < 0,05$

Caracterización fisicoquímica

Variable	Existe DS	Factores	Interacciones	Repeticiones
pH	Si	A,B y C	AB, AC, BC y ABC	No
Acidez	Si	A	AB y AC	No
Humedad	No	-	-	-
Ceniza	No	-	-	-
Grasa	Si	A	AB, AC y BC	No
Proteína	Si	A,B y C	AB, AC, BC y ABC	No

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Factor A (Tipo de producto)

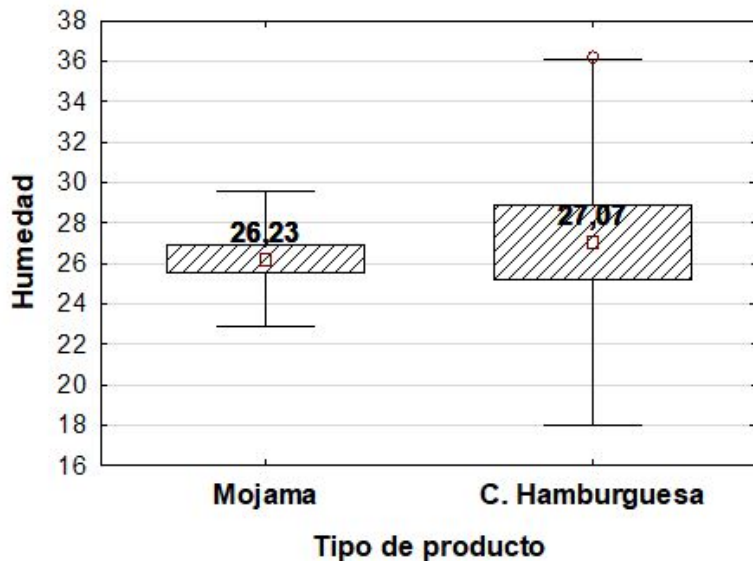


El pH está dentro de los rangos permitidos por las norma INEN, entre 5 a 7,7 y están entre los datos reportados por (Granja Cedeño., 2022) entre 6,05 a 6,44.

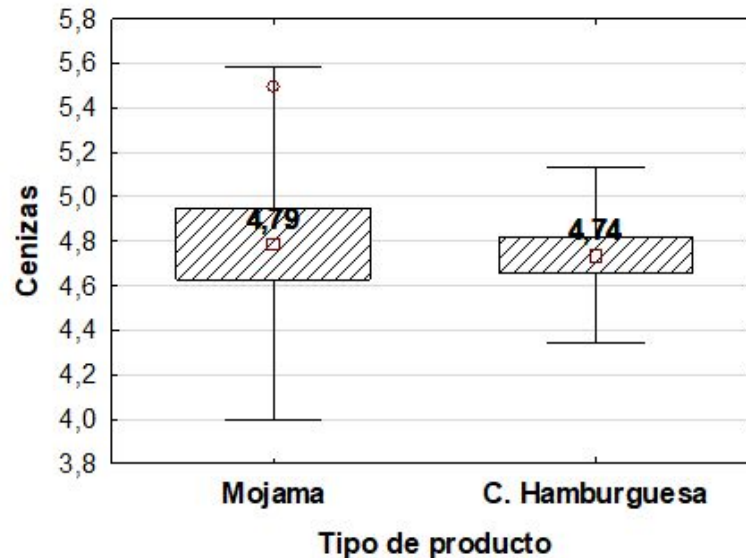
(Granja Cedeño., 2022) en la especie *O. niloticus* obtuvo resultados similares de 0,24% a 0,39%. Mientras que, en la especie *O. mossambicus* obtuvo resultados inferiores de 0,24% a 0,36%. Según (Cao., et al., 2015) el aumento de los valores de acidez se debe a la acción de las BAL.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Factor A (Tipo de producto)



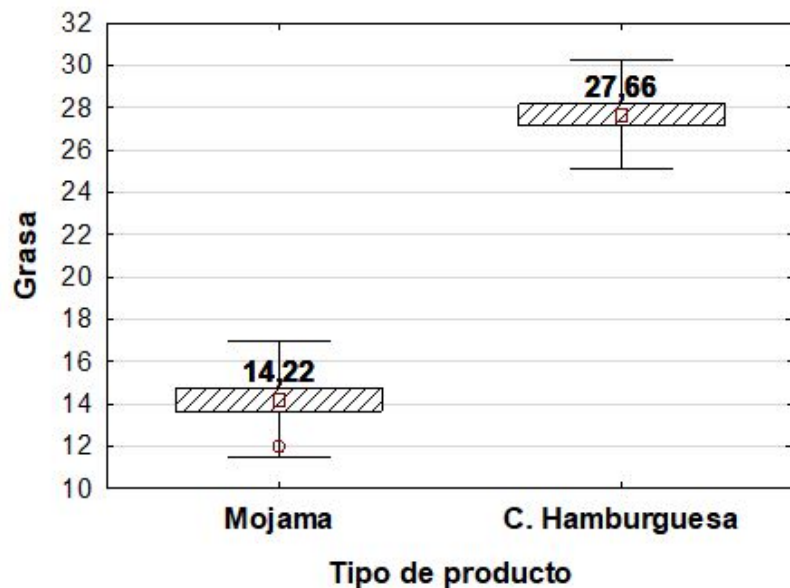
Los valores se encuentran por debajo de lo reportado por (Neira Mosquera., et al., 2020) en conservas de paiche con valores que van de 45,66% a 63,01%.



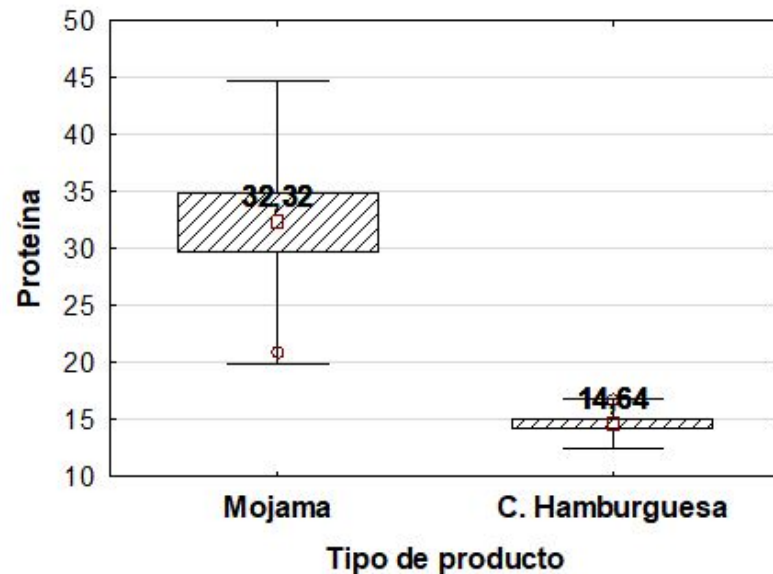
Estos valores son superiores a los obtenidos en el estudio de (Neira Mosquera., et al., 2020) en conservas de paiche con un valor tope de 1,97%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Factor A (Tipo de producto)



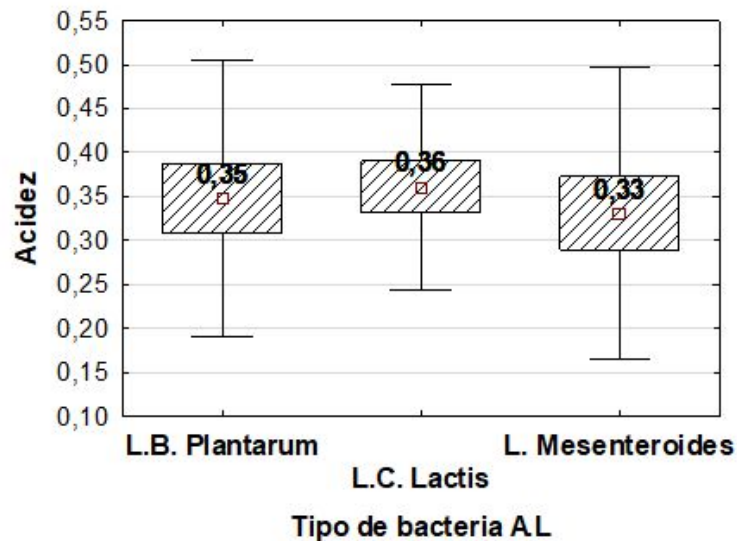
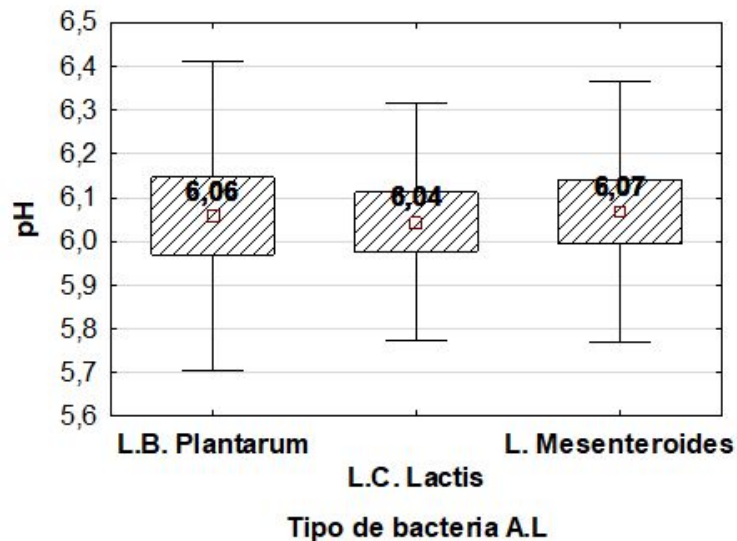
Se encontró diferencia significativa, esto se debe por un ingrediente que tiene la hamburguesa (tocino de cerdo).



A diferencia que en la grasa, la mojama cuenta con un mayor índice proteico por la no adición de tocino de cerdo, se encontró diferencia significativa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Factor B (Tipo de bacteria)

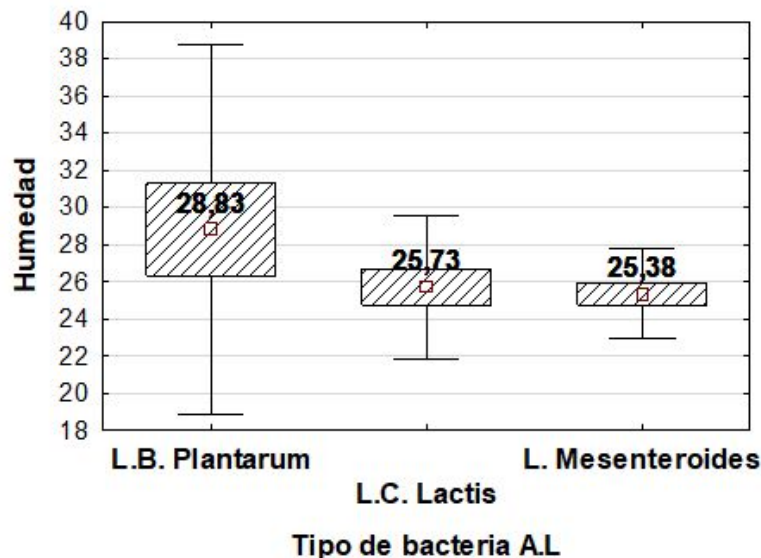


Presentaron diferencia significativa, los cuales están dentro del rango según (Jurado Gálvez., et al., 2009), los cuales son entre 5,8 y 6,3.

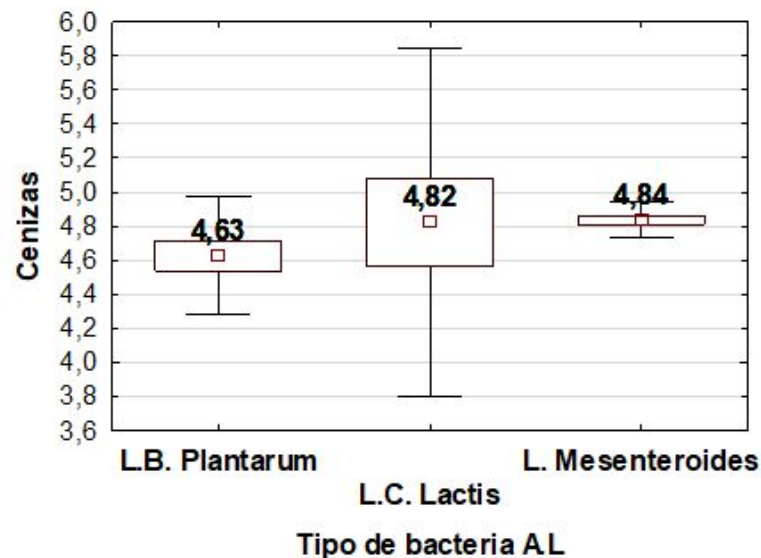
En este tratamiento no se encontró diferencia significativa, y están ligeramente por arriba del promedio según (Jurado Gálvez., et al., 2009), esto es debido al aumento de la producción de ácidos orgánicos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Factor B (Tipo de bacteria)



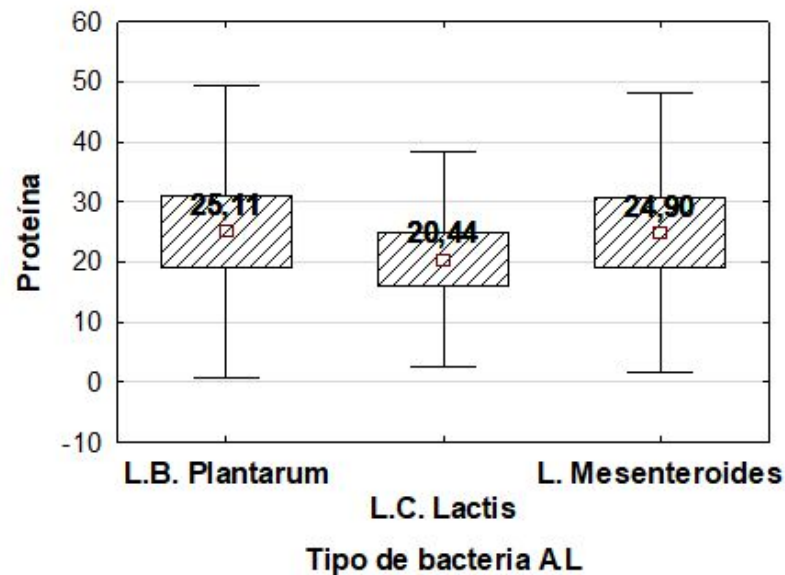
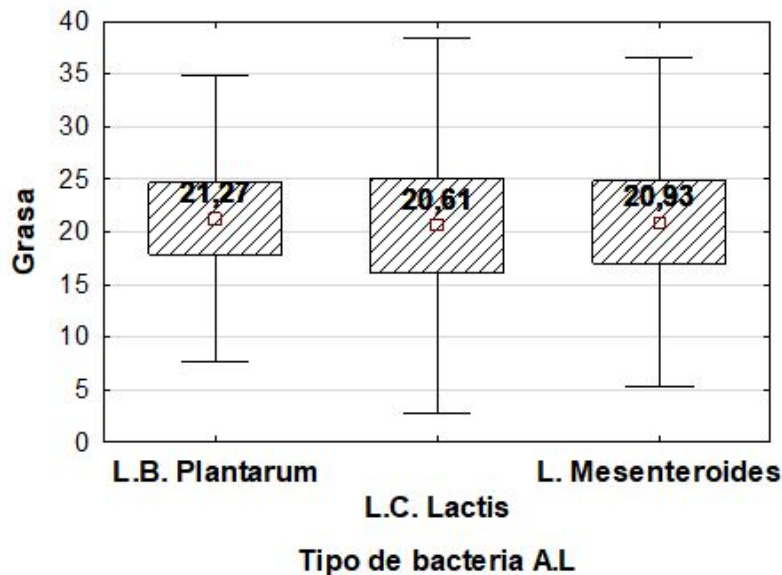
No presentó diferencia significativa. el contenido máximo de humedad es de 75,84%, comparando (Chávez., 2015), se demuestra que está dentro de lo establecido por dicho autor



No presentó diferencia significativa. Estos valores son superiores al rango que ofrece la (FAO., 2001) de 1,02% a 1, 50%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Factor B (Tipo de bacteria)

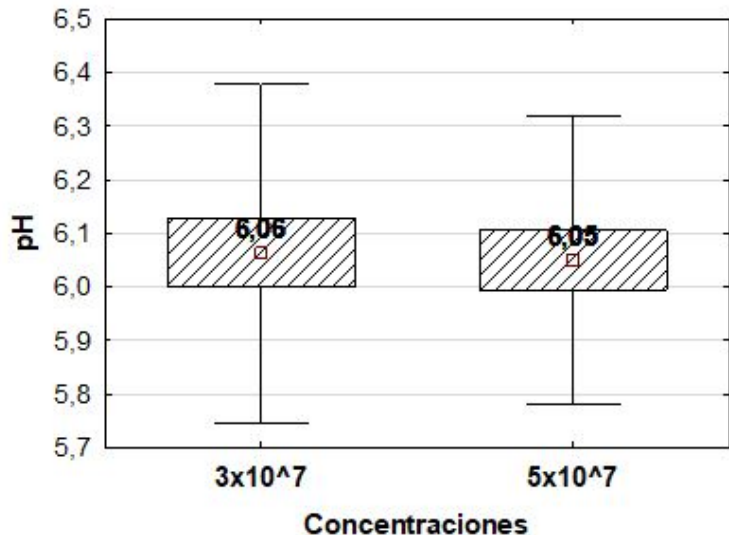


No presenta diferencia significativa, según un estudio realizado por (Chávez., 2015), se obtuvieron valores superiores al porcentaje máximo de grasa establecido de 17% para el paiche

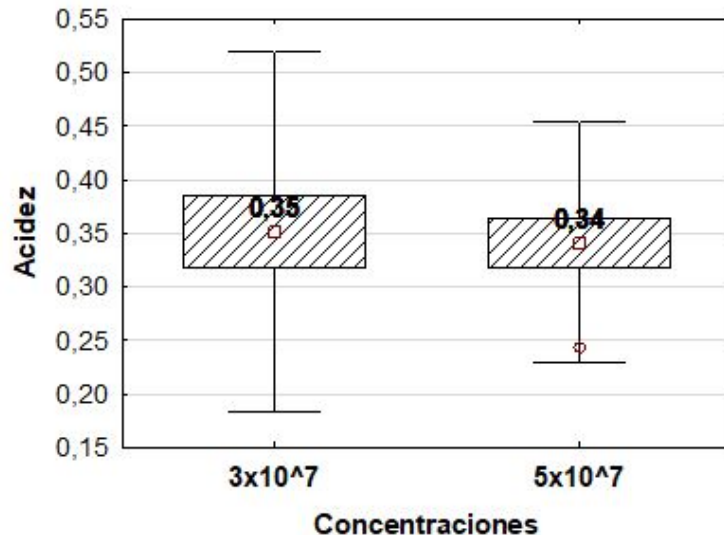
Muestra diferencia significativa, la diferencia entre cada uno de los resultados, dependen de las propiedades de las bacterias individualmente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Factor C (Concentraciones)



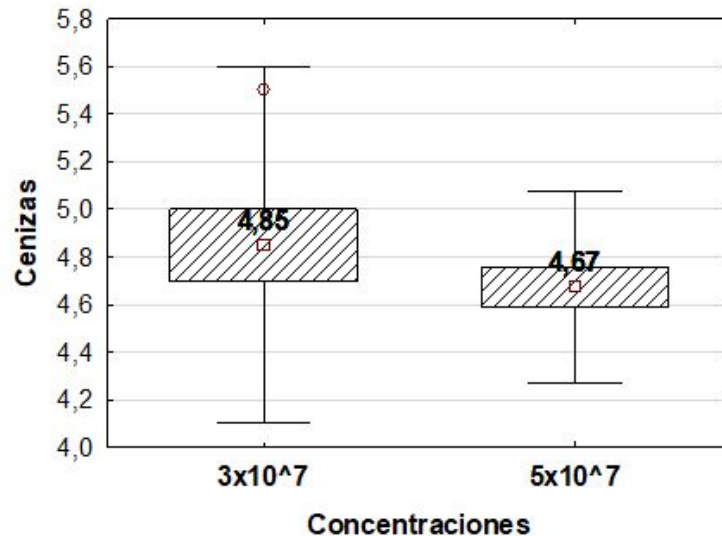
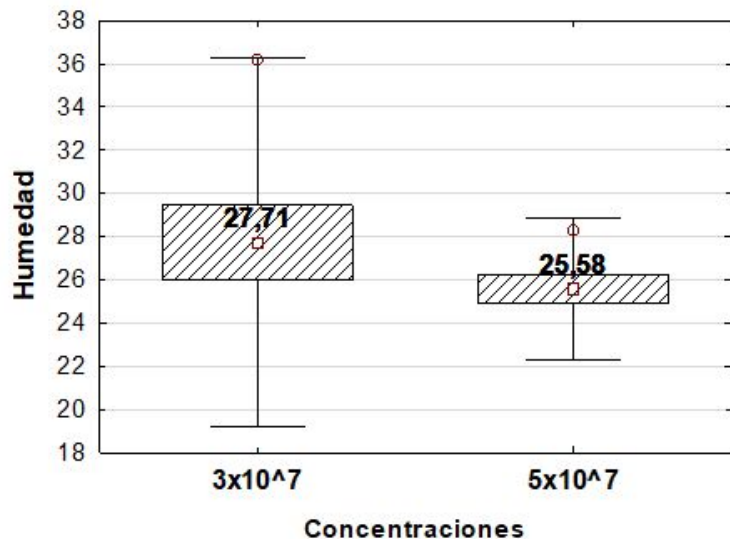
Se encuentran cerca del rango encontrado por (Granja Cedeño., 2022) quien presenta valores entre 6,09 a 6,23.



(Granja Cedeño., 2022) obtuvo valores similares de acidez de 0,34% a 0,39%. Según el estudio de (Rodríguez., et al., 2009) los valores de acidez controlan el estado de deterioro del pescado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

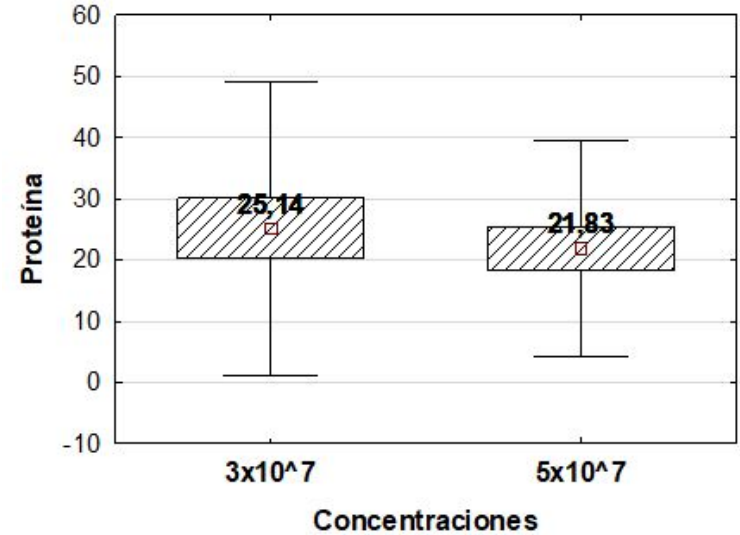
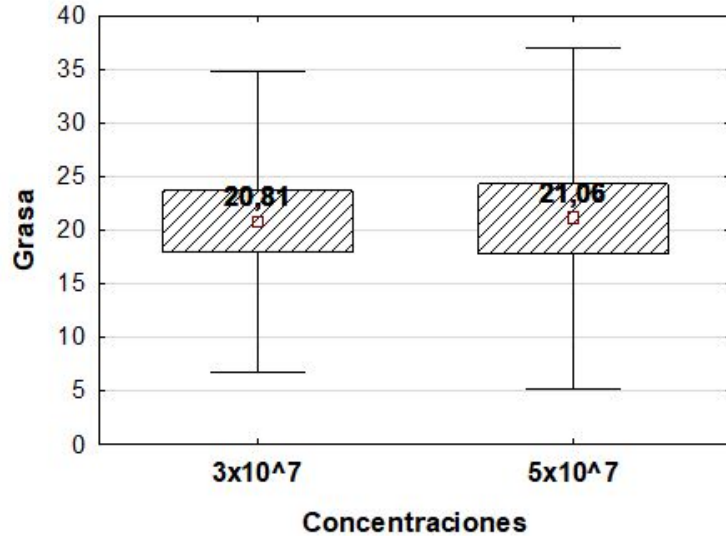
Factor C (Concentraciones)



Se obtuvieron resultados inferiores en relación con la investigación de (Granja Cedeño., 2022) con tratamientos tratados con 10,15% y 20% de BAL al día 10, donde obtuvo valores de 73,66% a 76,74%.

Estos valores se encuentran sobre el rango establecido por (Granja Cedeño., 2022) con valores de 1,03% a 1,45%.

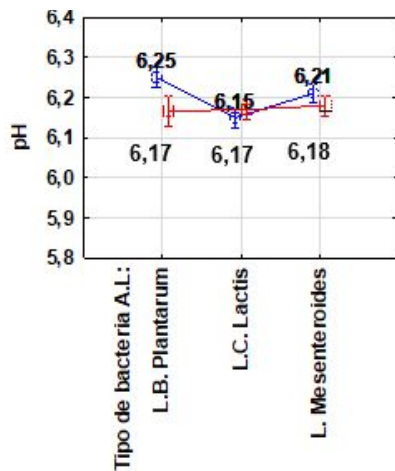
Factor C (Concentraciones)



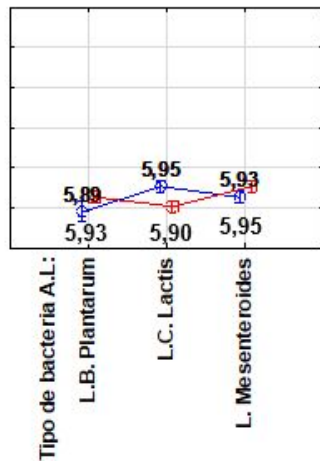
Estos valores concuerdan con el valor nutritivo aceptable de pescado de 0,2% a 25% de grasa establecido por (Valls., 2007).

Estos resultados son superiores al rango encontrado por (Contreras y Cardiles., 2013) de 16,5% a 18,4%. Sin embargo, se encuentra en el parámetro establecido por (Valls., 2007) de 15% a 39%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



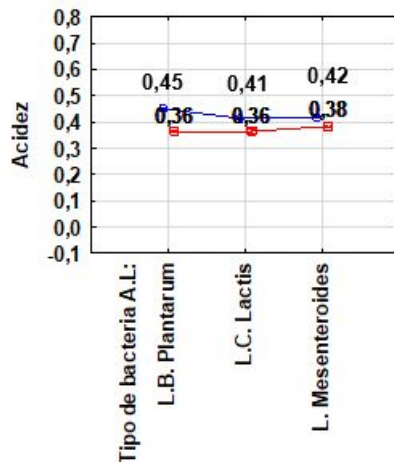
Tipo de producto: Mojama



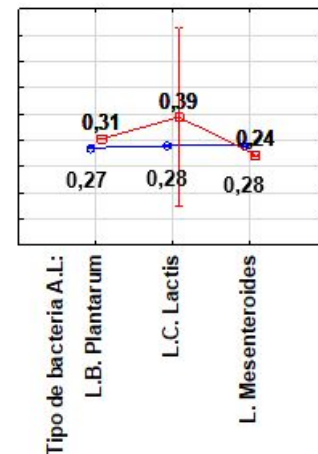
Tipo de producto: C.
Hamburguesa

Concentraciones 3×10^7
 Concentraciones 5×10^7

Interacción (A x B x C)



Tipo de producto: Mojama



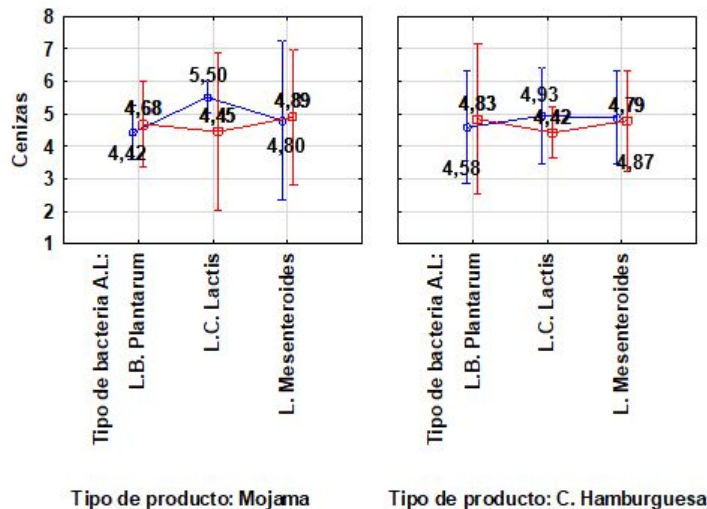
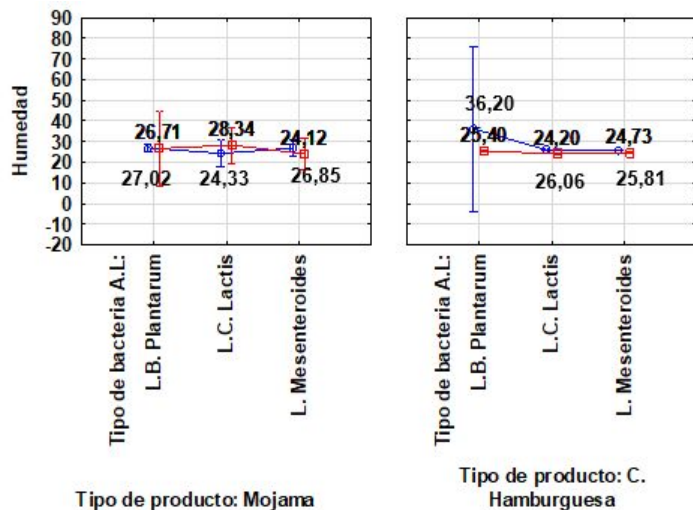
Tipo de producto: C.
Hamburguesa

El valor más alto se obtuvo en el tratamiento (**a0b2c0**), por otra parte, se obtuvo un menor valor de media para el tratamiento (**a1b0c0**). Estos valores concuerdan a lo obtenido por (Granja Cedeño., 2022).

El valor más alto se obtuvo en el tratamiento (**a0b0c0**), por otra parte, se obtuvo un menor valor de media para el tratamiento (**a1b2c1**). Según (Parra., 2010) la acidez involucra directamente la formación de ácidos orgánicos por parte de las BAL.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Interacción (A x B x C)

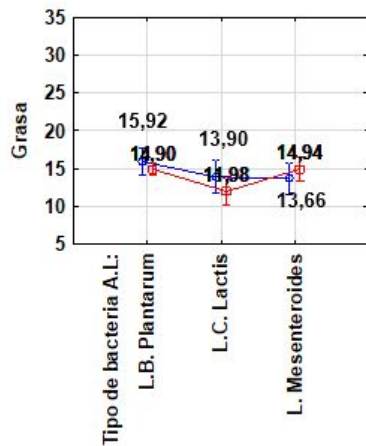


El valor más alto se obtuvo en el tratamiento (**a1b0c0**), por otra parte, se obtuvo un menor valor de media para el tratamiento (**a0b2c1**). Según (Chávez., 2015) el tope máximo para la humedad del paiche está en 74,85%.

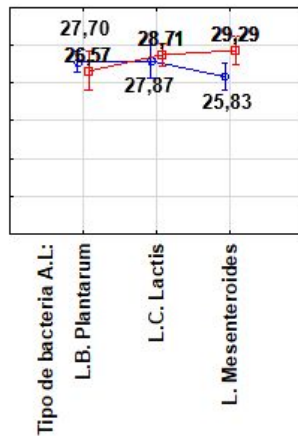
El valor más alto se obtuvo en el tratamiento (**a0b1c0**), por otra parte, se obtuvo un menor valor de media para el tratamiento (**a0b0c0**). Siendo estos valores superiores a lo encontrado por (Granja Cedeño., 2022).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Interacción (A x B x C)

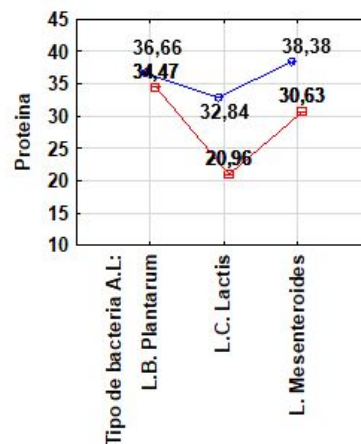


Tipo de producto: Mozzarella

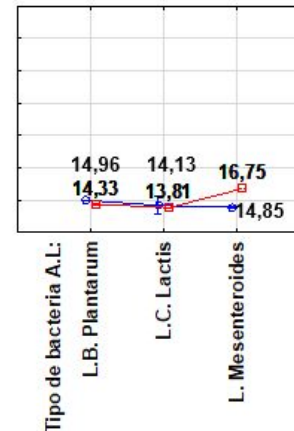


Tipo de producto: C. Hamburguesa

Concentraciones 3×10^7
 Concentraciones 5×10^7



Tipo de producto: Mozzarella



Tipo de producto: C. Hamburguesa

El valor más alto se obtuvo en el tratamiento (**a1b2c1**), por otra parte, se obtuvo un menor valor de media para el tratamiento (**a0b1c1**). Estos valores se encuentran dentro del rango establecido por (Valls., 2007) de 0,2% a 25%.

El valor más alto se obtuvo en el tratamiento (**a0b2c0**), por otra parte, se obtuvo un menor valor de media para el tratamiento (**a1b1c1**). Estos valores se deben principalmente a la formulación de la hamburguesa, ya que se añade tocino.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis microbiológico

- > (Mohos y Levaduras): T4
- < (Mohos y Levaduras): T8
- > (Aerobios): T11
- < (Aerobios): T2

N°	Mohos y Levaduras (UFC/mL)	Aerobios (UFC/mL)
T1	$1,3 \times 10^{-3}$	3×10^{-4}
T2	$2,2 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-}$
T3	$1,7 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^{-4}$
T4	$1,5 \times 10^{-2}$	2×10^{-3}
T5	$2,1 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-3}$
T6	$2,2 \times 10^{-2}$	$2,2 \times 10^{-2}$
T7	$2,5 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-3}$
T8	$1,2 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-3}$
T9	$1,9 \times 10^{-2}$	$1,8 \times 10^{-4}$
T10	$1,8 \times 10^{-2}$	$3,7 \times 10^{-3}$
T11	$2,8 \times 10^{-3}$	$3,8 \times 10^{-4}$
T12	$2,4 \times 10^{-3}$	$3,3 \times 10^{-4}$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de conglomerados

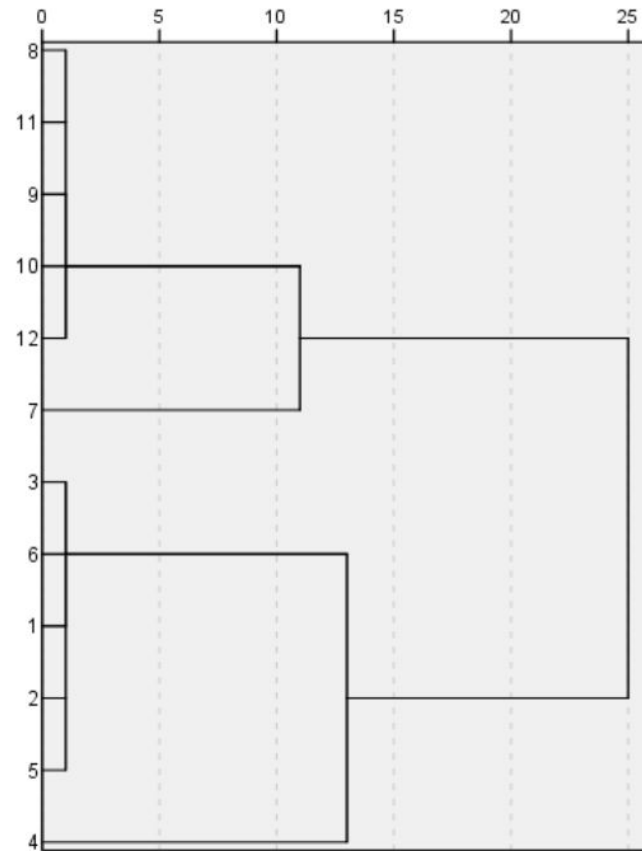
Se obtuvieron 2 estrechas relaciones:

- **1** (8,11, 9, 10, 12)
- **2** (3,6,1,2,5)

Los grupos que obtuvieron una menor relación:

- **4**
- **7**

C. Hamburguesa + L.B. Plantarum + 5×10^7
C. Hamburguesa + L. Mesenteroides + 3×10^7
C. Hamburguesa + L.C. Lactis + 3×10^7
C. Hamburguesa + L.C. Lactis + 5×10^7
C. Hamburguesa + L. Mesenteroides + 5×10^7
C. Hamburguesa + L.B. Plantarum + 3×10^7
Mojama + L.C. Lactis + 3×10^7
Mojama + L. Mesenteroides + 5×10^7
Mojama + L.B. Plantarum + 3×10^7
Mojama + L.B. Plantarum + 5×10^7
Mojama + L. Mesenteroides + 3×10^7
Mojama + L.C. Lactis + 5×10^7



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Matriz de correlaciones de los componentes principales evaluados

Matriz de correlaciones

	pH	Acidez	Humedad	Cenizas	Grasa	Proteína
pH	1,000	,796	-,180	,041	-,948	,926
Acidez	,796	1,000	-,261	-,048	-,761	,796
Humedad	-,180	-,261	1,000	-,363	,105	-,151
Cenizas	,041	-,048	-,363	1,000	-,119	,155
Grasa	-,948	-,761	,105	-,119	1,000	-,852
Proteína	,926	,796	-,151	,155	-,852	1,000

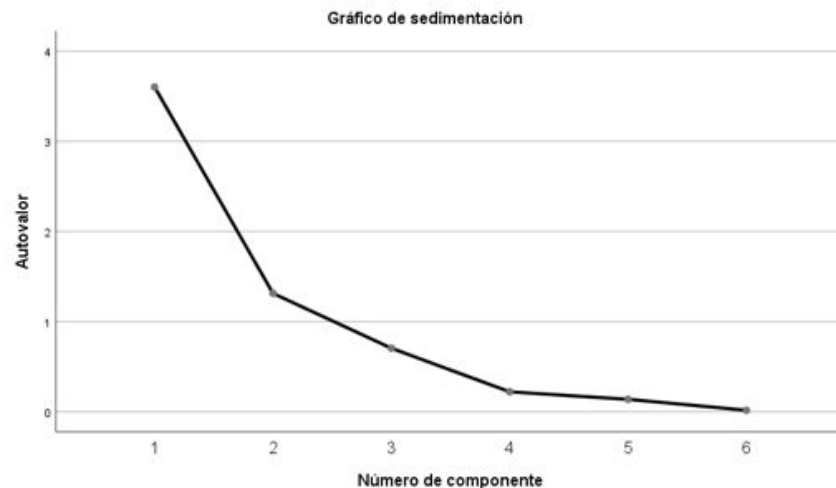
Correlación (+)		Correlación (-)	
pH	Acidez	Acidez	Grasa
pH	Proteína	pH	Grasa
Acidez	Proteína	Grasa	Proteína

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Grafico de sedimentación de componentes principales

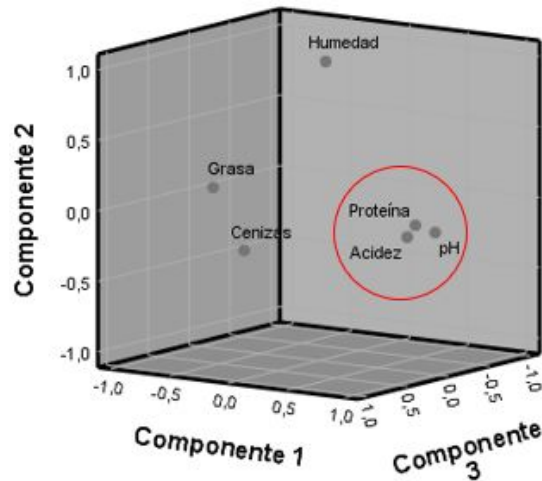
Componente	Variable	Autovalores	% de Varianza
1	pH	3,602	60,042
2	Acidez	1,314	21,898

En tanto que en los componentes 5 y 6 fue donde menos variabilidad entre variables se encontró.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Gráfico de componentes en espacio rotado mediante Kaiser-varimax



Se obtuvo una fuerte correlación entre la variable pH, acidez y la proteína.

CONCLUSIONES

Factor A: Se pudo determinar que los valores en cuanto a las variables pH Con 6,19 y 5,93, acidez con 0,40% y 0,29%, y grasa con 14,22% y 27,66%, para mojama y hamburguesa respectivamente cada uno de los valores, siendo estos datos reportados, óptimos para la bioconservación de productos cárnicos de paiche (*Arapaima gigas*) con bacterias ácido lácticas (BAL).

Factor B: Analizando los resultados, se obtuvieron los siguientes valores de pH en cada una de las bacterias, 6,06 para *L. plantarum*, 6,04 para *L. lactis* y 6,07 para *L. meserentoides*, los cuales están dentro del rango según (Jurado Gálvez., et al., 2009). La acidez se ve influenciada por la producción de ácidos orgánicos, los cuales se obtuvieron valores de 0,35% para *L. plantarum*, 0,36% para *L. lactis* y 0,33% para *L. meserentoides*, están ligeramente por arriba del promedio según (Jurado Gálvez., et al., 2009), esto es debido al aumento de la producción de ácido orgánicos.

Factor C: De acuerdo con los distintos análisis realizados a la carne de hamburguesa y mojama, se pudo determinar que las concentraciones de 3×10^{-7} UFC/ml obtuvo mejores valores en las variables pH con 6,06, acidez con 0,35 y proteína con 25,14%, siendo estos valores óptimos en el caso de los parámetros acidez y pH para controlar el estado de deterioro del pescado.

Interacción A*B*C: De acuerdo con los análisis fisicoquímicos realizados a los productos cárnicos; los mejores tratamientos para cada uno de los análisis fueron: al analizar el pH, el mejor tratamiento fue (**a0b2c0**) mojama + *L. mesenteroides* + 3×10^{-7} UFC/ml con un valor de 6,21, teniendo una media entre 6,05 a 6,44 (Sulistiani y Handayani., 2018).

RECOMENDACIONES

Según los tipos de producto evaluados mojama y carne de hamburguesa se recomienda la aplicación de bacterias ácido lácticas: *L. plantarum*, *L. mesenteroides* y *L. lactis* en los dos productos cárnicos, debido a que los valores de acidez fueron de 0,29 % para mojama y 0,40% para hamburguesa, impidiendo el crecimiento de microorganismos que afecten la salud de los consumidores.

En cuanto a los tipos de bacterias utilizadas se recomienda la utilización de la bacteria *L. plantarum*, considerando que los resultados del efecto bioconservante son mejores que los reportados por *L. mesenteroides* y *L. lactis*, ya que al compararlo con otras investigaciones refleja valores de proteína, pH y acidez superiores a los reportados.

Con respecto a las concentraciones aplicadas en este estudio es recomendable aplicar la concentración de 3×10^7 UFC/ml, debido a que reporta valores de 6,06 para pH y 25,14% para proteína elevados a los encontrados en la concentración 5×10^7 UFC/ml, lo que favorece al control del estado de deterioro de pescado, puesto que los valores de pH contribuyen a la conservación del pescado.

BIBLIOGRAFÍA

Avdalov N (2014) Beneficios del consumo de pescado. DINARA – INFOPECA. Montevideo

Axelsson, L. T. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. En: Salminen, S., Von Wright, A., Ouwehand, A. (Eds.), Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. 3rd rev. and exp. Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, pp.1-66

Barrera, F., & Almeyra, B. (2010). Efecto de la densidad de siembra en el crecimiento de juveniles de Paiche (*Arapaima gigas*) en estanques de la Estación Pesquera Ahuashiyacu.

Berra, T. (2004). Freshwater fish distribution. Academic Press, Florida, USA

Campos Baca, L. (2001). Historia biológica del paiche o pirarucu (*Arapaima gigas*, cuvier) y bases para su cultivo en la Amazonía, Iquitos-Perú.

Cao, R., Liu, Q., Chen, S., Yang, X., & Li, L. (2015). Application of Lactic Acid Bacteria (LAB) in freshness keeping of tilapia fillets as sashimi. Journal of Ocean University of China, 14(4), 675–680. doi:10.1007/s11802-015-2682-1.

Carvajal-Vallejos, F. M., Van Damme, P. A., Cordova, L., & Coca, C. (2011). La introducción de *Arapaima gigas* (paiche) en la Amazonía boliviana. *Los Peces y Delfines de la Amazonía Boliviana: Hábitats, Potencialidades y Amenazas*, ed. Paul A Van Damme, Fernando M Carvajal-Vallejos, and Jorge Molina Carpio, 367-396

GRACIAS