



PRODUCCIÓN DE AMINAS BIOGÉNICAS EN CARNE DE BOVINO CONSERVADA CON ÁCIDO LÁCTICO DE ORIGEN QUÍMICO Y BACTERIANO

BIOGENIC AMINE PRODUCTION IN BEEF PRESERVED WITH LACTIC ACID OF CHEMICAL AND BACTERIAL SOURCES

M. L. Signorini¹ e I. Guerrero-Legarreta^{2*}

¹Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - Estación Experimental Rafaela (INTA EEA Rafaela). Departamento de Epidemiología y Enfermedades Infecciosas. Ruta 34 Km. 227, Rafaela (C.P. 2300), Provincia de Santa Fe, Argentina.

²Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco 186, C.P. 09340, México D.F., México.

Recibido 10 de Noviembre 2008; Aceptado 22 de Marzo 2009

Resumen

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de tres bacterias lácticas bioprotectoras (BAL) y del ácido láctico sobre la concentración de aminas biogénicas en carne empacada al vacío y almacenada bajo refrigeración y condiciones de abuso de temperaturas. Las muestras de carne molida fueron inoculadas con BAL (*Lactobacillus carnis*, *Lactobacillus pentosus* y *Staphylococcus carnosus*) o mezcladas con ácido láctico, y almacenadas a 4 y 20°C durante 12 y 6 días, respectivamente. Las concentraciones de aminas biogénicas (histamina, cadaverina, putrescina y tiramina) fueron analizadas mediante HPLC. El ácido láctico y las tres BAL redujeron la concentración de histamina en la carne almacenada a 20°C a menos de 0.25 mg/kg; en comparación con el grupo control que mostró una concentración de aminas biogénicas de 4.91 mg/kg. Sin embargo, las BAL no fueron eficaces en la reducción de cadaverina, putrescina y tiramina, independientemente de la temperatura de almacenamiento. La carne tratada con ácido láctico mostró las menores concentraciones de putrescina y tiramina, lo que permitió concluir que fue efectivo en el control de la producción de aminas biogénicas en carne empacada al vacío, mientras que las BAL no pudieron prevenir su formación. La inoculación con BAL no controla el crecimiento de algunos microorganismos alterantes y, en consecuencia, son incapaces de reducir los niveles de aminas biogénicas. Lo anterior permite concluir que la calidad microbiológica inicial de la carne es un factor determinante en el control de la concentración de aminas biogénicas durante el almacenamiento.

Palabras clave: aminas biogénicas, ácido láctico, bacterias lácticas, carne.

Abstract

The objective of this study was to analyze the effect of inoculating three protective lactic acid bacteria (LAB) and lactic acid addition on biogenic amine production in vacuum-packaged beef, stored under refrigeration and at temperature-abuse conditions. Ground meat samples were inoculated with one of the following LAB: *Lactobacillus carnis*, *Lactobacillus pentosus* or *Staphylococcus carnosus*, or mixed with lactic acid; and stored at 4 or 20°C for 12 or 6 days, respectively. Biogenic amine concentration (histamine, cadaverine, putrescine and tyramine) was analyzed by HPLC. Lactic acid and the inoculated LAB reduced biogenic amine to a concentration lower than 0.25 mg/kg in samples stored at 20°C; amine concentration in control samples was 4.91 mg/kg. However, LAB failed to reduce cadaverine, putrescine and tyramine concentrations, regardless of storage temperature. Meat samples treated with lactic acid showed the lowest putrescine and tyramine concentrations. This fact allowed concluding that lactic acid is an efficient means to control biogenic amine production in vacuum packaged beef, whereas LAB cannot prevent amine formation. LAB do not control the growth of several spoilage microorganisms and, in consequence, these protective strains do not reduce biogenic amine levels. Therefore, initial microbial meat quality is determinant for biogenic amine production during beef storage.

Keywords: biogenic amines, lactic acid, lactic acid bacteria, meat.

* Autora para la correspondencia. E-mail: meat@xanum.uam.mx
Tel: (52)(55) 5804 47 17; Fax (52)(55) 5804 47 17

1. Introducción

El músculo *postmortem* ofrece un ambiente altamente nutritivo a la microflora contaminante, pudiendo satisfacer sus necesidades básicas para el crecimiento. Este proceso se acelera como resultado de abusos térmicos que acontecen a lo largo de la cadena de comercialización del producto. La descarboxilación de aminoácidos por parte de ciertos géneros de bacterias alterantes presentes en la carne, genera compuestos básicos nitrogenados denominados aminas biogénicas, los cuales presentan un bajo peso molecular; están formados por la descarboxilación de aminoácidos o la aminación y transaminación de aldehídos y cetonas (Silla-Santos, 1996). Los prerrequisitos necesarios para su formación incluyen la disponibilidad de aminoácidos libres, la presencia de microorganismos descarboxilasa positivos y de condiciones necesarias para el crecimiento microbiano, la síntesis y el mantenimiento de la actividad de las descarboxilasas. La producción de aminas biogénicas en alimentos puede verse afectada por factores tales como temperatura, concentración de sales (Chander y col., 1989), presencia de carbohidratos fermentables, tensión de oxígeno, potencial redox y, fundamentalmente, pH. El consumo de aminas biogénicas por parte de individuos sanos no representa un riesgo, debido a que los sistemas de monoaminaoxidasas, diaminaoxidasas y poliaminaoxidasas logran detoxificarlas. Sin embargo, los individuos con problemas coronarios o respiratorios, o aquellos que presentan enfermedades que debilitan el sistema de aminooxidasas (alcoholismo, deficiencia de vitamina B, problemas gastrointestinales, entre otras), son poblaciones de riesgo ante estas sustancias. La determinación de aminas biogénicas en alimentos es importante, no solo desde el punto de vista toxicológico, sino también porque estos compuestos pueden utilizarse como indicadores del grado de alteración de los alimentos. En carne fresca, los recuentos elevados de putrescina, cadaverina y tiramina han sido relacionados con concentraciones elevadas de *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae* y bacterias lácticas, respectivamente (Eerola y col., 1996; Masson y col., 1996). El ácido láctico es el principal metabolito producido por las bacterias lácticas (BAL) homofermentativas y ha sido utilizado como agente sanitizante en carnes, con el objetivo de incrementar la seguridad de estos alimentos. El empleo de este ácido orgánico puede reducir la población de microorganismos alterantes y generar menores tasas de crecimiento de microorganismos patógenos como *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. Este ácido ha sido usado para estos fines, debido a que es un constituyente natural de la carne *post-rigor* y es una sustancia aceptada como segura (GRAS). El uso de BAL como bioconservadores en materiales de origen

animal, como carnes (Minor y Guerrero Legarreta, 2003) y residuos marinos (Shriai y col., 1996; Armenta y col., 2002) ha sido considerado como una alternativa a los preservantes químicos, ya que pueden crecer en el sustrato cárnico e inhibir el desarrollo de microorganismos alterantes y patógenos. El modo de acción de estas bacterias incluye la competencia por los nutrientes, la adhesión al sustrato y la producción de ácidos orgánicos (especialmente ácido láctico), diacetilo, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas. Algunos autores reportan la eficiencia de estos tratamientos como agentes bioprotectores en carnes y productos cárnicos; así como su efecto potencial en el control de las poblaciones de microorganismos alterantes, microorganismos patógenos y sobre la concentración de aminas biogénicas. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del tratamiento de tres BAL y ácido láctico sobre la concentración de aminas biogénicas en carne empacada al vacío y almacenada bajo refrigeración o sometida a abusos térmicos.

2. Materiales y métodos

2.1. Muestras de carne

Estas fueron obtenidas a partir del músculo *Psoas major* de bovino después de 6 a 7 horas *post mortem*. No se registraron datos sobre la raza, sexo y edad de los animales o condiciones previas. Con el objeto de minimizar la población microbiana inicial, la superficie cárnica fue flameada y tratada bajo estrictas condiciones de esterilidad. La carne fue molida en una moladora doméstica (Moulinex, México) previa sanitización de las superficies de contacto con la muestra por medio de alcohol etílico y flameado de la cuchilla. Finalmente se dividió la carne en porciones de 50 g e inoculadas con las cepas de BAL bajo estudio y la adición de ácido láctico.

2.2. Preparación de los inóculos

Las BAL empleadas fueron: *Lactobacillus carnis* MXVK76 (Queen's University of Belfast, Belfast, Northern Ireland, U.K.), *Lactobacillus pentosus* (Christian Hansen, LP1-31035) y *Staphylococcus carnosus* (Christian Hansen, MC1-02055). Las cuales fueron seleccionadas debido a su limitada actividad proteolítica, lipolítica y aminodescarboxilante (Signorini y col., 2003). Las cepas fueron reactivadas en caldo APT (Becton Dickinson) por 24 h a 30°C. La suspensión celular fue centrifugada a 4000xg por 10 min a 4°C y las muestras de carne inoculadas con 10⁵ UFC/g. El ácido láctico (200 mg/100 g de carne) fue aplicado como tratamiento químico de acuerdo a lo reportado por Nassos y col. (1983). La carne tratada y el control fueron colocadas en bolsas Cryovac™ LB-50 (Cryovac, México) y sometidas a vacío empleando

una empacadora Multivac D-8941 (Koch, Kansas City) a -700 mBar. Las muestras fueron almacenadas a 4°C y, simulando la temperatura ambiente promedio del centro de México, a 20°C por 12 y 6 días respectivamente. Para la realización de los análisis, se tomaron muestras los días 0, 4, 8 y 12 (para la carne almacenada bajo refrigeración) y los días 0, 2, 4 y 6 (para la carne almacenada a 20°C).

2.3. pH

El pH de cada muestra se determinó por triplicado, empleando un potenciómetro Beckman (Beckman, Fullerton), previa homogeneización de 10 g de carne con 90 mL de agua destilada estéril en una licuadora doméstica a máxima velocidad durante 30 seg.

2.4. Recuento de bacterias lácticas y *Enterobacteriaceae* spp.

Se mezclaron 10 g de carne con 90 mL de agua destilada estéril y se homogeneizaron (Oster, Bartlesville). A partir de esta pasta se realizaron diluciones seriadas empleando agua destilada como diluyente. La población de bacterias lácticas fue determinada mediante la inoculación en agar MRS (Merck, Darmstadt, Alemania). Para el recuento de *Enterobacteriaceae* spp., las diluciones fueron inoculadas en agar VRBG (Merck). Las cajas se incubaron a 30°C durante 2 días.

2.5. Determinación de aminas biogénicas por HPLC

La determinación de aminas biogénicas presentes en la carne se realizó de acuerdo al método reportado por Hwang y col. (1997). Se homogeneizaron en una licuadora doméstica (Oster) 5 g de carne con 20 mL de ácido tricloroacético (Baker) al 6%, durante 1 min. El homogeneizado se centrifugó a 8000xg durante 10 min a 4°C y el sobrenadante se filtró a través de un papel de filtro Whatman No 2. El filtrado se transfirió a un matraz y se aforó a 25 mL con ácido tricloroacético al 6%. Dos mililitros del filtrado se homogeneizaron con 10 µL de cloruro de benzoilo y 1 mL de hidróxido de sodio 2 M, incubándose durante 40 min a 30°C. La derivatización se detuvo con 2 mL de una solución de NaCl 5 M y las amidas resultantes fueron extraídas con 3 mL de éter etílico. La fase orgánica fue evaporada hasta sequedad en un rotavapor Büchi O11 (Büchi, Flawil, Suiza) y el residuo fue disuelto en 500 µL de metanol grado HPLC. Se tomaron alícuotas de 50 µL, previamente filtradas a través de acrodiscos de 0.45 µm, las cuales fueron inyectadas en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Waters (Waters, Milford) equipado con una bomba 626 y un detector de arreglo de diodos UV-VIS 994 integrados a un software Millennium versión 2.1 (Waters). Se empleó una columna de fase inversa Symmetry C18 (Waters) de 150 mm de longitud, 3.9

mm de diámetro y un tamaño de partícula de 5 µm. El flujo de la fase móvil empleado fue de 0.5 mL / min, siguiendo un programa de elusión con metanol al 100% y 55%. El cromatograma se obtuvo a una longitud de onda de 254 nm. Cada muestra fue analizada por triplicado.

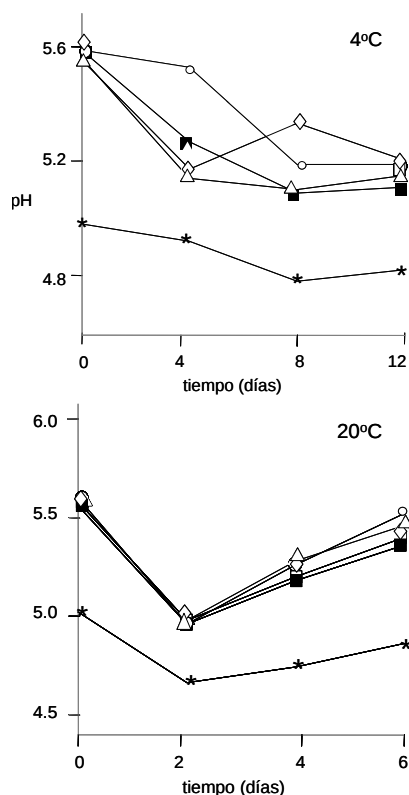
2.6. Diseño experimental y análisis estadístico de los datos

Las muestras de carne fueron asignadas al azar a los diferentes tratamientos (control, adicionada con ácido láctico, inoculación con *L. carnis*, *L. pentosus* y *S. carnosus*), realizando 12 repeticiones del experimento. El efecto de la inoculación con BAL y la adición de ácido láctico fue analizada en un diseño factorial 5x4; los datos fueron sujetos a un análisis de la varianza y comparación múltiple de medias de Duncan. Adicionalmente, se realizaron análisis de correlación para determinar la posible asociación existente entre las variables relacionadas con la producción de aminas biogénicas. Los análisis fueron realizados usando el paquete estadístico SAS (SAS Institute, 1998).

3. Resultados y discusión

3.1. pH

La carne almacenada a temperaturas de refrigeración mostró los menores niveles de pH ($p < 0.001$), siendo inmediata la reducción del pH luego de la adición de ácido láctico (Fig. 1) en concordancia con lo reportado por Greer y Dilts (1994). Las muestras inoculadas con *L. carnis* y *L. pentosus* presentaron una mayor reducción en el pH que la tratada con *S. carnosus* ($p < 0.05$). Esta observación estuvo de acuerdo con las curvas de crecimiento de las bacterias lácticas (Signorini y col., 2006). Los valores bajos de pH se asociaron con el crecimiento de microorganismos productores de ácidos orgánicos, los cuales se vieron favorecidos por un ambiente con bajas concentraciones de oxígeno. Estos resultados estuvieron en concordancia con los de Guerrero-Legarreta y col. (1995), Minor-Pérez y col. (2002) y Minor-Pérez y col. (2004), quienes reportaron reducciones significativas del pH en carne bovina y de cerdo inoculada con BAL. Se han propuesto muchas teorías para explicar el mecanismo de acción antibacteriano del ácido láctico, siendo la más aceptada la capacidad del ácido para atravesar la membrana celular en su forma no disociada, disociarse en el interior celular y generar, como consecuencia, una caída del pH intracelular (Prado y col., 1996; Brul y Coote, 1999). La proporción de ácido láctico no disociado aumenta conforme disminuye el pH, por lo que la contribución del pH cárnico en la eficiencia bacteriostática no puede ser ignorada. Los bajos niveles de pH presentados en la carne tratada con ácido láctico genera que una gran



■ *L. carnis* △ *L. pentosus* ◇ *S. carnosus* *AL ○ Control
Fig. 1. pH de la carne tratada con ácido láctico y bacterias acidolácticas a 4°C y 20°C

proporción del ácido orgánico se presente en su forma no disociada, lo que explicaría la gran capacidad antibacteriana mostrada por dicho compuesto. La carne almacenada a 20°C mostró una reducción en el pH solamente cuando se le adicionó ácido láctico ($p < 0.001$), alcanzando valores por debajo de 4.7 a las 48 h de almacenamiento. Las BAL no redujeron significativamente el pH ($p < 0.289$) en comparación con la carne control (Fig. 1). El pH de la carne tratada con BAL disminuyó aproximadamente 0.6 unidades al segundo día de almacenamiento, para luego incrementar su valor y finalizar el estudio con un nivel similar al día 0. De acuerdo con Gill y Newton (1980), la reducción de la concentración de glucosa en la carne acontece cuando la población de *Lactobacillus* spp. alcanza 10^8 UFC/g, cuando esto ocurre, el ácido láctico y los aminoácidos son metabolizados por las bacterias alterantes, especialmente *Pseudomonas* spp. y enterobacterias, produciendo amoníaco e incrementando el pH (Greer, 1988 y 1989).

3.2. Crecimiento de bacterias lácticas y enterobacterias

El recuento de BAL fue significativamente superior en la carne inoculada con *Lactobacillus carnis* y *L. pentosus* ($p < 0.001$), lo que evidencia una gran adaptabilidad al sustrato, a la temperatura de

incubación y al ambiente cárnico almacenado bajo vacío por parte de estas cepas de bacterias bioprotectoras. La concentración de BAL en carne tratada con ácido láctico fue aproximadamente un ciclo logarítmico inferior con respecto al control ($p < 0.01$), especialmente en los primeros cuatro días de almacenamiento bajo refrigeración. Si bien las BAL producen dicho compuesto, como consecuencia de su metabolismo fermentativo, es probable que la concentración del ácido utilizada durante el diseño experimental fuera lo suficientemente elevado como para inducir un efecto bacteriostático sobre este grupo microbiano. Las BAL presentes en la carne control, pertenecientes a la microbiota nativa, permanecieron aproximadamente un orden de magnitud por debajo de la concentración evidenciada en la carne inoculada con *L. carnis* y *L. pentosus*, excepto al final del periodo de almacenamiento. El tratamiento con ácido láctico fue el más efectivo para reducir el número de enterobacterias ($p < 0.01$), alcanzando reducciones de aproximadamente 1.5 log UFC/g en comparación con las concentraciones encontradas en la carne control. Asimismo, los tratamientos con *L. carnis* y *L. pentosus* provocaron disminuciones significativas en los recuentos de enterobacterias ($p < 0.01$) con respecto al control de aproximadamente 1 ciclo logarítmico. Las BAL no mostraron fase de latencia durante su crecimiento en la carne almacenada bajo refrigeración, multiplicándose y disminuyendo el pH desde el inicio del experimento, compitiendo de tal forma con los microorganismos alterantes. Por su parte, cuando la carne se almacenó bajo condiciones de abuso de temperatura, el tratamiento con ácido láctico mostró los menores recuentos de BAL ($p < 0.01$) y enterobacterias ($p < 0.01$). Esto es una evidencia de la importante actividad antibacteriana de este ácido. El ácido láctico logró controlar el número de enterobacterias, alcanzando reducciones en la población final de 2.5 ciclos logarítmicos con respecto al control. Los recuentos de BAL ($p < 0.05$) fueron superiores estadísticamente para la carne inoculada con *L. carnis* y *L. pentosus* en comparación con la carne control. Esto demuestra la capacidad de adaptación de estos cultivos bioprotectores al sustrato cárnico. *L. carnis* y *L. pentosus* mostraron recuentos de enterobacterias significativamente menores ($p < 0.05$) en comparación con el control. Estos cultivos bioprotectores lograron reducciones en el recuento de enterobacterias de aproximadamente 0.5 ciclos logarítmicos con respecto al control, reducciones importantes considerando que las enterobacterias constituyen uno de los grupos microbianos alterantes nativos más importantes y que encuentran a 20°C condiciones óptimas para su crecimiento. Si bien la población inicial de este grupo microbiano alterante (aproximadamente de 3 log UFC/g) fue inferior a la reportada por Pérez-Chabela y col. (1995), constituye una cuenta inicial muy elevada en comparación con carne obtenida en frigoríficos de otros países, en

donde la cuenta microbiana total no supera los 2.5 log UFC/g y el recuento de enterobacterias es inferior a 1.5 log UFC/g lo que genera una menor efectividad antibacteriana por parte de los tratamientos ácido lácticos.

3.3. Concentración de aminas biogénicas

La concentración de histamina en la carne almacenada a 4°C fue superior en la carne control, aunque dicho aumento no resultó estadísticamente significativo ($p < 0.268$). Eerola y col. (1996) tampoco encontraron reducciones en la concentración de histamina en carne por la adición de cultivos bioprotectores. Es interesante destacar que en la carne control la elevación de dicha amina biogénica se presentó a partir del cuarto día de almacenamiento, mientras que en los tratamientos ácido lácticos se incrementó más tardíamente su concentración (Fig. 2). Los tratamientos ácido lácticos no mostraron tampoco un efecto significativo para reducir la concentración de tiramina en carne cruda almacenada a esta temperatura ($p < 0.262$). Esta amina presentó un incremento en su concentración a partir del cuarto día de almacenamiento bajo refrigeración, permaneciendo en valores relativamente constantes hasta el final del estudio (Fig. 2). Eerola y col. (1996) tampoco reportan reducciones en la concentración de tiramina con la adición de BAL, concluyendo que la inclusión de cultivos bioprotectores no es una garantía para prevenir la formación de aminas biogénicas. Es probable que la flora nativa de la carne fuera la responsable de la elevación en los niveles de tiramina, ya que los cultivos bioprotectores no presentaban actividad descarboxilante *in vitro* frente a tirosina. La

concentración de cadaverina no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados ($p < 0.597$). Los tratamientos ácido lácticos no lograron reducir su concentración con respecto a la carne control, lo que se contradice con Quintero-Salazar y col. (2006), quienes reporta reducciones significativas en la concentración de cadaverina en carne de pollo mediante el empleo de cultivos bioprotectores y nisina. A lo largo del período de almacenamiento, la concentración de cadaverina mostró reducidos incrementos siendo el aumento más marcado a partir del día 12 de almacenamiento (Fig. 2). La carne tratada con ácido láctico provocó la aparición de concentraciones de putrescina significativamente ($p < 0.05$) menores que las de los restantes tratamientos (Fig. 2). Los cultivos bioprotectores, por el contrario, se mostraron ineficientes para reducir la concentración de esta amina con respecto a la carne control ($p < 0.317$). Estos resultados se contradicen con los reportados por Quintero-Salazar y col. (2006) quienes observaron reducciones significativas en la concentración de putrescina en carne de pollo, mediante el empleo de cultivos bioprotectores y nisina. Bover-Cid y col. (2001) señalan que la producción de putrescina se da fundamentalmente por la asociación entre BAL y enterobacterias, mediante la cual las BAL descarboxilan la arginina hasta ornitina y las enterobacterias descarboxilan esta última originando putrescina. Es posible suponer que la interacción de la flora láctica nativa y las enterobacterias presentes en la carne en altas concentraciones (este grupo microbiano fue el único capaz de crecer bajo anaerobiosis y bajo pH), haya generado un incremento en la concentración de putrescina, tornando ineficiente la acción de los cultivos bioprotectores.

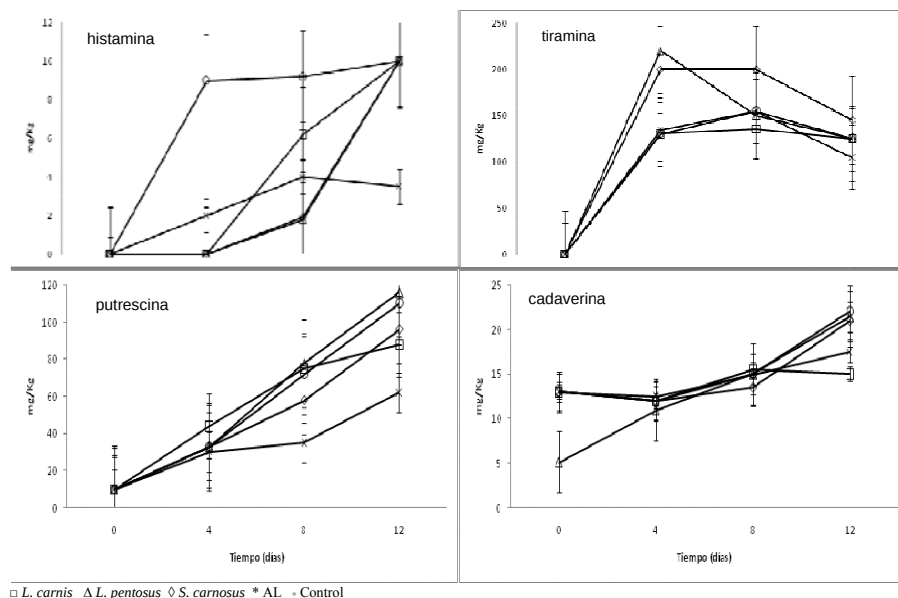


Fig. 2. Concentración (mg/kg) de histamina, tiramina, cadaverina y putrescina en carne almacenada a 4°C.

A pesar de que la población de enterobacterias se vio reducida por acción de los tratamientos con BAL es probable que esta disminución no haya sido suficiente como para limitar la generación de putrescina. El tratamiento con ácido láctico, por el contrario, podría haber logrado reducir la concentración de putrescina al controlar tanto la población de BAL como la de enterobacterias. En el presente trabajo la concentración de putrescina superó a la de cadaverina, hecho que se contradice con lo reportado por Halász y col. (1994), quienes afirman que los niveles de cadaverina son superiores a los de putrescina en carne cruda. Esto estaría sugiriendo la presencia de una microflora nativa particularmente especializada en la descarboxilación de la arginina o la existencia de una interacción entre diferentes grupos microbianos que, en conjunto, generen una mayor producción de putrescina, tal como lo sugieren Bover-Cid y col. (2001). Cuando la carne se almacenó simulando abuso térmico, los tratamientos ácido lácticos se mostraron eficientes para reducir la concentración de histamina con respecto a la muestra control ($p < 0.001$) (Fig. 3). Maijala y col. (1995) reportan resultados similares respecto de la producción de histamina, concluyendo que el empleo de cultivos bioprotectores puede ser utilizado, con efectos benéficos, para controlar la formación de histamina. Resultados similares fueron reportados por Guillén-Velasco y col. (2004), reduciendo la producción de histamina en carne de pescado mediante la adición de una cepa de *S. carnosus* como cultivo bioprotector. El tratamiento de la carne con ácido láctico fue el único capaz de reducir de forma significativa la concentración de tiramina con respecto al control ($p < 0.05$). La carne control mostró los niveles superiores de esta amina pero no fueron estadísticamente significativas con respecto a los cultivos bioprotectores ($p < 0.335$) (Fig. 3). Bauer y col. (1994) encontraron concentraciones similares en carne de cerdo almacenada a 18°C, a pesar de no incluir microorganismos descarboxilantes de la tirosina como cultivos

bioprotectores, por lo que consideran a esta amina como indicador de deterioro. La descarboxilación de tirosina ha sido relacionada de forma frecuente con las BAL (Masson y col, 1996), presentando éstas la máxima producción de tiramina a pH 5.0. Si bien las bacterias bioprotectoras inoculadas en la carne no presentaban actividad aminodescarboxilasa *in vitro*, es probable que la flora láctica nativa sea la responsable de la generación de esta amina al encontrar un ambiente propicio para su producción. Se observó una correlación positiva significativa ($r = 0.448$; $p < 0.001$) entre el nivel de BAL y la concentración de tiramina en la carne, lo que apoya este supuesto. Al reducir la población nativa de estas BAL, el ácido láctico pudo controlar la generación de tiramina, presentando las concentraciones más bajas de este compuesto. La concentración de cadaverina no mostró diferencias significativas al comparar los tratamientos aplicados ($p < 0.657$). La concentración de esta amina se incrementó a medida que transcurría el almacenamiento, (Fig. 3) alcanzando hacia el día 6 niveles similares a los reportados por Bauer y col. (1994) en carne porcina almacenada a 18°C. El ácido láctico fue también el único tratamiento efectivo para reducir la concentración de putrescina en la carne con respecto al control ($p < 0.05$). Los cultivos bioprotectores mostraron concentraciones inferiores a la presentada por el control, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p < 0.417$) (Fig. 3). La concentración de putrescina se incrementó conforme avanzaba el período de almacenamiento, alcanzando niveles finales muy elevados, concordantes con la apreciación organoléptica. Según Byun y col. (2000), la concentración de aminas biogénicas, especialmente putrescina, está altamente correlacionada con el recuento de bacterias totales y psicrótrofos totales, hecho que se demuestra en este estudio, ya que la concentración de putrescina está correlacionada significativamente con el recuento de enterobacterias ($r = 0.507$; $p < 0.001$).

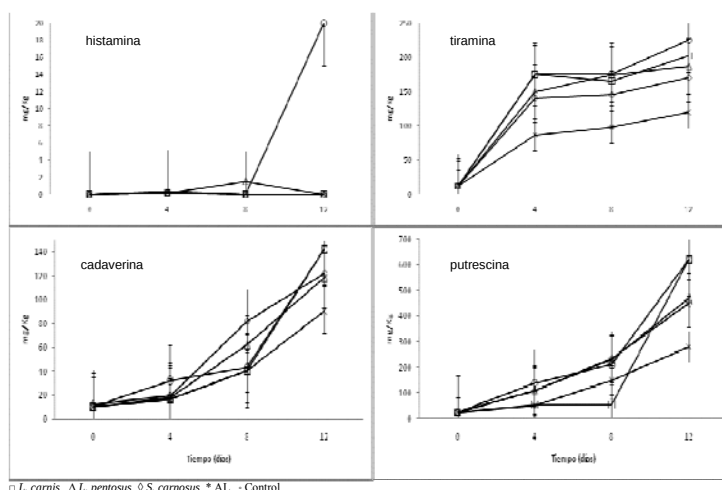


Fig. 3. Concentración (mg/kg) de histamina, tiramina, cadaverina y putrescina en carne almacenada a 20°C.

Estos resultados coinciden con los de Bover-Cid y col. (2001), quienes reportan un incremento en la producción de putrescina cuando la carne bovina es almacenada a 18°C, alcanzándose niveles similares a los determinados en el presente trabajo. Las bacterias que se encuentran frente a una situación estresante, como un ambiente ácido provocado por la adición de un ácido orgánico o por la producción de éste a partir de BAL, responden de diferente manera con el objetivo de mantener su pH interno cerca de la neutralidad. Uno de los mecanismos utilizados es la descarboxilación de aminoácidos, con el consumo de un H^+ en el proceso (Bearson y col., 1997). Las enterobacterias fueron los microorganismos que lograron la mejor adaptación a las condiciones de temperatura, tensión de oxígeno y pH encontradas en el estudio. De igual forma, las enterobacterias son los principales microorganismos descarboxilantes en carnes envasadas al vacío, descarboxilan lisina (con la producción de cadaverina) y arginina (con la producción de agmatina y putrescina). *Salmonella* spp. utiliza principalmente la descarboxilación de lisina, mientras que *Escherichia coli* y *Shigella* spp., entre otros emplean la descarboxilación de arginina como mecanismo principal de homeostasis. En el presente trabajo se observó que los principales incrementos se dieron en los niveles de putrescina, pudiendo inferirse la participación de grupos microbianos específicos en su producción.

Al igual que lo ocurrido durante el almacenamiento en refrigeración, es probable que el ácido láctico haya conseguido reducir la concentración de putrescina al controlar tanto la población de BAL como de enterobacterias. Esto permitiría también explicar la falta de eficiencia por parte de las bacterias bioprotectoras para conseguir reducir los niveles de producción de putrescina. Se han reportado correlaciones significativas entre la calidad microbiológica de la carne y la concentración de aminas biogénicas. Los niveles de putrescina, cadaverina y tiramina mostraron una correlación significativa con el tiempo de almacenamiento en condiciones de abuso térmico ($r=0.590$, $p<0.001$; $r=0.554$, $p<0.001$ y $r=0.421$, $p<0.001$; respectivamente). Se han asociado las poblaciones de coliformes, superiores a 5 log UFC/g de carne fresca, con el aumento en la concentración de cadaverina, mientras que es necesaria una población de 5 log UFC/g para observar incrementos en la concentración de putrescina (Byun y col, 2000). Este hecho se observó también en el presente estudio, donde la producción de putrescina y cadaverina comienza a incrementarse exponencialmente cuando la concentración de enterobacterias en carne supera los 5 log UFC/g (Fig. 4). Por su parte, los niveles de tiramina se elevan exponencialmente una vez que los niveles de BAL llegaron a 7 log UFC/g (Fig. 4). En estudios anteriores (Chander y col., 1989) se encontró que la producción de aminas biogénicas ocurría en un pH óptimo de aproximadamente 5.0; en nuestro estudio no hubo una relación marcada entre

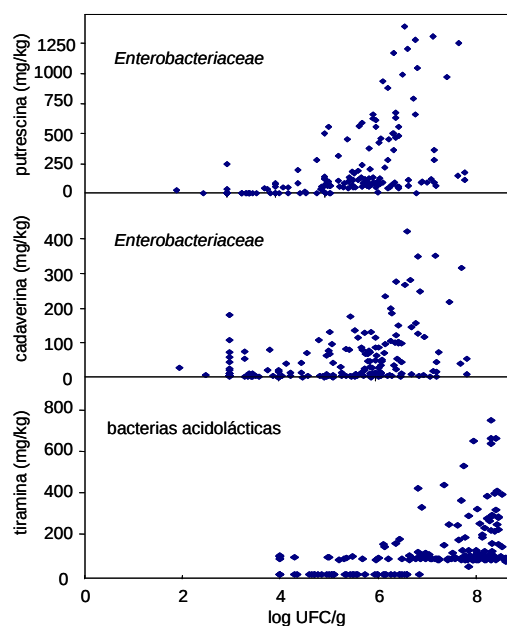


Fig. 4. Efecto de la población de *Enterobacteriaceae* y bacterias acidolácticas sobre la concentración de putrescina, cadaverina y tiramina.

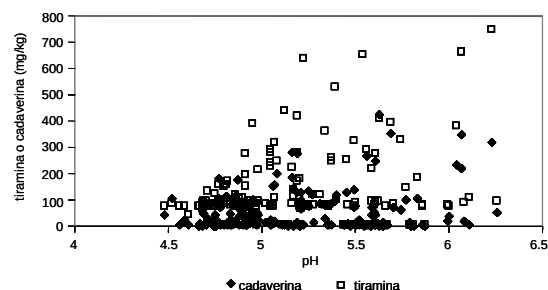


Fig. 5. Relación entre el pH de la carne y la concentración de cadaverina y tiramina.

los valores de pH cárnicos y la producción de las diferentes aminas biogénicas, encontrándose los niveles más elevados de aminas en un amplio intervalo de pH, desde 5.0 hasta 6.0 (Fig. 5).

Conclusiones

Los tratamientos ácido-lácticos redujeron la concentración de histamina en carne cuando ésta fue almacenada bajo condiciones de abuso térmico. Por el contrario, las BAL fueron incapaces de reducir la concentración de aminas biogénicas, tanto a 4°C como a 20°C. El ácido láctico generó los menores niveles de putrescina y tiramina en carne almacenada a 20°C, así como de putrescina a 4°C, lo que demuestra su efectividad antimicrobiana. Las aminas biogénicas pueden ser halladas como consecuencia de la actividad microbiana y sus niveles se incrementan paralelamente al desarrollo de bacterias alterantes. La calidad microbiana es un factor esencial para lograr bajos niveles de aminas biogénicas en la carne; por lo que las buenas

prácticas de manufactura son el principal método de prevención de la contaminación en carnes.

Agradecimientos

Marcelo L. Signorini, agradece a la Secretaría de Relaciones Exteriores de México por la beca otorgada bajo el programa Cuauhtemoc II.

Referencias

- Armenta, R.E., Guerrero Legarreta, I. y Huerta, S. (2002). Extracción de carotenoproteínas a partir de residuos de camarón fermentados. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 1, 49-55.
- Bauer, F., Seuss, Y., Paulsen, P. y Vali, S. (1994). The formation of biogenic amines in meat and meat products. *Proceedings 40th International Congress of Meat Science and Technology*, La Haya, Holanda.
- Bearson, S., Bearson, B. y Foster, J.W. (1997). Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiology Letters* 147, 173-180.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M. y Vidal-Carou, M.C. (2001). Changes in biogenic amine and polyamine contents in slightly fermented sausages manufactured with and without sugar. *Meat Science* 57, 215-221.
- Brul, S., y Coote, P. (1999). Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiol.ogy* 50, 1-17.
- Byun, J.S., Park, K.S., Oh, D.H., Kim, J.W. y Lee, M. (2000). Comparison of indicators for microbial quality of meat during aerobic cold storage. *Proceedings 46th International Congress of Meat Science and Technology*. Buenos Aires, Argentina. pp. 734-735.
- Chander, H., Batish, V.K., Babu, S. y Singh, R.S. (1989). Factors affecting amine production by a selected strain of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Food Science* 54(4), 940-942.
- Eerola, S., Majjala, R., Roig-Sagués, A.X., Salminen, M. y Hirvi, T. (1996). Biogenic amines in dry sausages as affected by starter culture and contaminant amine-positive *Lactobacillus*. *Journal of Food Science* 61(6), 1243-1246.
- Gill, C.O. y Newton, K.G. (1980). Growth of bacteria on meat at room temperatures. *Journal of Applied Bacteriology* 49(2), 315-323.
- Greer, G.G. (1988). Bacteria and meat quality. *31st. Conference of the Canadian Institute of Food Science and Technology*, Winnipeg, Canadá.
- Greer, G.G. (1989). Red meats, poultry and fish. En: *Enzymes of Psychrotrophs in Raw Food*. (R.C. McKellar, ed.). Pp. 267-292. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Greer, G. y Dilts, B.D. (1994). Lactic acid inhibits growth on pork lean and fat. *Proceedings 40th International Congress of Meat Science and Technology*, La Haya, Holanda.
- Guerrero-Legarreta, I., Mendiola, R., Ponce, E. y Prado, A. (1995). Inoculation of lactic acid bacteria on meat surfaces as a means of decontamination in semitropical conditions. *Meat Science* 40(3), 397-411.
- Guillén-Velasco, S., Ponce, E., Farrés, A. y Guerrero-Legarreta, I. (2004). Histamine production by two *Enterobacteriaceae* strains isolated from tuna (*Thunnus thynnus*) and Jack mackerel (*Trachurus murphyi*). *International Journal of Food Properties* 7(1), 91-103.
- Halász, A., Baráth, Á., Simon-Sarkadi, L. y Holzapfel, W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology* 5, 42-49.
- Hwang, D.F., Chang, S.H., Shiu, C.Y. y Chai, T.J. (1997). High-performance liquid chromatographic of biogenic amines in fish implicated in food poisoning. *Journal of Chromatography B* 693, 23-30.
- Masson, F., Talon, R. y Montel, M.C. (1996). Histamine and tyramine production by bacteria from meat products. *International Journal of Food Microbiology* 32, 199-207.
- Majjala, R., Eerola, S., Lievonon, S., Hill, P. y Hirvi, T. (1995). Formation of biogenic amines during ripening dry sausages as affected by starter culture and thawing time or raw materials. *Journal of Food Science* 60(6), 1187-1190.
- Minor, H., Ponce, E., Macías Bravo, S. y Guerrero Legarreta, I. (2002). Conservación de carne fresca de cerdo por fermentación láctica: efecto sobre el color, la textura y la formación de los ácidos grasos libres. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 1, 73-80.
- Minor, H. y Guerrero Legarreta, I. 2003. Efecto de la fermentación láctica con *Staphylococcus carnosus* y *Lactobacillus alimentarius* sobre la fracción miofibrilar de proteínas de carne de cerdo. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 2(1), 57-62.
- Minor-Pérez, H., Ponce, E., Macías Bravo, S. y Guerrero-Legarreta, I. (2004). Changes in long chain fatty acids and microbial populations of pork inoculated with two biopreservative strains. *Meat Science* 66, 793-800.
- Nassos, P.S., King, A.D., y Stafford, A.E. (1983). Relationship between lactic acid concentration and bacterial spoilage in ground beef. *Applied and Environmental Microbiology* 46 (4), 894-900.
- Pérez-Chabela, M.L., Pérez, L., Rodríguez, G., Lara, P., Guerrero Legarreta, I. 1995. Microflora

- evolution during ageing and spoilage of beef in Mexico City's supermarkets. 41st. International Conference of Meat Science and Technology. San Antonio, Texas. pp. 245-247.
- Prado, A., Guerrero Legarreta, I., y Taylor A. (1996). Caracterización de un sistema cárnico modelo para el estudio de los factores que afectan la oxidación de lípidos. *Revista Avances en Ingeniería Química* 6(3), 242-246.
- Quintero-Salazar, B., Vernon, J., Guerrero-Legarreta, I. y Ponce, E. (2006). Incorporation of the antilisterial bacteriocin-like inhibitory substance from *Pediococcus parvulus* VKMX133 into film-forming protein matrices with different hydrophobicity. *Journal of Food Science* 70(9), 398-403.
- SAS Institute (1998). SAS User's Guide. SAS Institute, Cary, Carolina del Norte.
- Shirai, I. Guerrero Legarreta, S. Huerta, G. y Saucedo, G. Hall. (1996). Fermentación láctica de cabeza de camarón. *Revista Avances en Ingeniería Química* 6(3), 239-241.
- Signorini, M., Ponce-Alquicira, E. y Guerrero-Legarreta, I. (2003). Proteolytic and lipolytic changes in beef inoculated with spoilage microorganisms and bioprotective lactic acid bacteria. *International Journal of Food Properties* 60(1), 147-163.
- Signorini, M., Ponce, E. y Guerrero-Legarreta, I. (2006). Effect of lactic acid and lactic acid bacteria on spoilage microflora in vacuum-packed beef. *Journal of Muscle Foods* 17, 277-290.
- Silla-Santos, M.H. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology* 29, 213-231.