

Efecto de antimicrobianos naturales sobre la estabilidad físico-química, microbiológica y sensorial de hamburguesas de res mantenidas en refrigeración

Effects of natural antimicrobials on microbiological stability, pH, aspect and sensory properties of ground beef patties stored under refrigeration

Lorenzo Gómez Cárdenas^a, Edith Ponce-Alquicira^b, Renata Ernlund Freitas Macedo^c,
Maria Salud Rubio Lozano^a

RESUMEN

Se evaluó el efecto de la utilización de diferentes antimicrobianos naturales (nisina - 3%; lactato de sodio - 3%; lactato de potasio - 3%; acetato-lactato - 1%) sobre la estabilidad de hamburguesas de carne de res. En la primera etapa del estudio, las hamburguesas fueron inoculadas con *E. coli* y mantenidas en refrigeración por ocho días. En la segunda etapa, las hamburguesas, sin la inoculación de *E. coli*, fueron refrigeradas por 10 días. Las muestras se evaluaron para color, pH, conteo microbiológico y atributos sensoriales (hamburguesas de la segunda etapa). La adición de nisina promovió la mayor inhibición microbiana y la mejor estabilidad del pH de las hamburguesas. La adición de lactatos y acetato-lactato mostró significativo efecto de inhibición del crecimiento microbiano, sin presentar efecto sobre el color de la carne. No obstante de su efecto antimicrobiano, la adición de nisina afectó negativamente la aceptación sensorial de las hamburguesas.

PALABRAS CLAVE: Vida de anaquel, Nisina, Lactato, Antimicrobiano natural.

ABSTRACT

The effect of different natural antimicrobial agents (nisin - 3%, sodium lactate - 3%, potassium lactate - 3%, acetate-lactate - 1%) on beef patty shelf-life, aspect and consumer acceptance was evaluated. In the first experiment, patties were inoculated with *E. coli* and stored for 8 d at 4 °C. In the second experiment, patties were not inoculated with *E. coli* and stored for 10 d at 4 °C. During storage, patties were evaluated for microbial growth, pH, color and sensory properties (second experiment only). Addition of nisin provided the highest inhibition of microbial growth and maintained proper pH levels. Addition of the lactates and acetate-lactate also significantly inhibited microbial growth compared to the control and did not affect meat color. Despite its antimicrobial effect, addition of nisin negatively affected sensory acceptance of beef patties compared to the other treatments.

KEY WORDS: Shelf-life, Nisin, Lactate, Natural antimicrobial.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el sector industrial de los productos cárnicos procesados ha tenido una

INTRODUCTION

Processed meat products have enjoyed increasing consumer acceptance in recent years

Recibido el 20 de enero de 2012. Aceptado el 15 de mayo de 2012.

^a Laboratorio de Ciencia de la Carne, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Centro de Enseñanza Práctica, Investigación en Producción y Salud Animal. Av Cruz Blanca No. 486. Colonia San Miguel Topilejo, Delegación Tlalpan. 04500. Mexico, DF. Tel.: +52-55-8480810; fax: +52-55-8480514; msalud@unam.mx. Correspondencia al ultimo autor.

^b Departamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa. México.

^c Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR). Brasil.

gran expansión y aceptación en el mercado consumidor⁽¹⁾. Además del aspecto nutritivo, sensorial y de la conveniencia de preparación del producto, la seguridad alimentaria y el periodo de vida de anaquel también son atributos importantes en los productos cárnicos. Para la conservación de estos productos, el uso de conservadores naturales es una fuerte tendencia mundial. Los conservadores naturales de mayor potencial en la industria cárnica son las bacteriocinas, los lactatos y los extractos de semilla de toronja⁽²⁾.

Las sustancias producidas por *Lactococcus lactis*, llamadas bacteriocinas, han recibido gran atención entre los conservadores naturales. Las bacteriocinas actúan alterando la estructura y funcionalidad de la membrana citoplasmática a través de la formación de poros, provocando la salida de compuestos esenciales para la célula⁽³⁾. La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas representa un gran potencial para la industria alimenticia, ya que se pueden utilizar como conservadores biológicos, y tienen la ventaja de ser péptidos que son inactivados por proteasas del tracto digestivo y no forman compuestos secundarios peligrosos⁽⁴⁾.

La nisina es producida por *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* y es la única bacteriocina disponible comercialmente reconocida como sustancia segura (*Generally Regarded As Safe* - GRAS), habiendo sido aprobada para uso en alimentos en los EE.UU.⁽⁵⁾ y en la Unión Europea⁽⁶⁾.

La nisina tiene una amplia historia de uso seguro en alimentos y se ha documentado su efectividad en contra de agentes patógenos Gram positivos y microorganismos deteriorativos; sin embargo su uso en productos cárnicos no está regulado⁽⁷⁾.

Además de las bacteriocinas, otros compuestos orgánicos como las sales derivadas del ácido láctico (lactatos) y del ácido acético (acetatos) también han sido usados como conservadores naturales en alimentos. Los lactatos están naturalmente presentes en la carne, y su uso

in Mexico⁽¹⁾. In addition to ease of preparation, nutritional value and sensory acceptance, food safety and shelf-life are vital attributes in meat products. Use of natural preservatives for meat product preservation is a strong international trend. Those with the greatest potential in the meat industry are bacteriocines, lactates and grapefruit seed extracts⁽²⁾.

Bacteriocines are produced by *Lactococcus lactis* and have received extensive attention. Their antibiotic mechanism is to alter cytoplasmic membrane structure and functionality by forming pores in the membrane and thus allowing essential compounds to escape the cell⁽³⁾. Bacteriocines' antimicrobial activity suggests myriad food industry applications, because it allows their use as biological preservatives. Because they are peptides, they have the advantage of being inactivated by digestive tract proteases, preventing them from forming dangerous secondary compounds⁽⁴⁾.

Nisin is produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. It is the only commercially available bacteriocine recognized as Generally Regarded As Safe – GRAS, having been approved for use in foods in the United States⁽⁵⁾ and the European Union⁽⁶⁾. Nisin has a long history of safe use in food and is known to be effective against Gram-positive pathogens and spoilage microorganisms. Its use in meat products is not regulated⁽⁷⁾.

Organic compounds other than bacteriocines, such as derivatives of lactic acid (lactates) and acetic acid (acetates), have also been used as natural preservatives in food. Lactates occur naturally in meat, and the USDA-Food Safety and Inspection Service (USDA-FSIS) allows their use as natural preservatives at a maximum level of 3 g/100 g meat⁽⁸⁾. Levels of 1.5 to 3.0 g/100 g meat are widely used in the meat industry to improve meat attributes. Lactate products are commercially available with three different cations (calcium, potassium and sodium), and recent research has identified a balance between cost and functionality for their use in meat

es permitido como conservador natural por el *USDA-Food Safety and Inspection Service* (USDA-FSIS) en la cantidad límite de 3 g/100 g de carne⁽⁸⁾. La adición de 1.5 a 3.0 g de lactato/100 g de carne ha sido extensamente utilizada por la industria cárnica para mejorar los atributos de la carne. Comercialmente, hay disponibles productos de lactato con tres diferentes cationes (calcio, potasio y sodio). Recientemente estos compuestos se han utilizado en productos cárnicos obteniendo un balance entre costo y funcionalidad^(9,10,11,12). Los lactatos muestran propiedades antimicrobianas en contra de microorganismos no patógenos⁽¹³⁾ y patógenos⁽¹⁴⁾.

Los lactatos y los acetatos han sido utilizados para mejorar la calidad de los productos cárnicos curados o cocidos; sin embargo, existen pocos reportes de su uso en carne cruda^(15,16).

Muchos estudios describen el uso de nisina aisladamente o en combinación con otras sustancias naturales como aceites esenciales y especias^(17,18,19) o de los lactatos y acetatos para la inhibición de patógenos, para la mejora de la calidad y la vida de anaquel de los productos cárnicos^(16,20,21), pero hay una carencia de estudios que comparen la acción de la nisina con la de los lactatos y acetatos en hamburguesas de res. Además, aunque estos conservadores naturales sean utilizados en productos cárnicos en otros países, en México su uso se ve limitado por la falta de información sobre su efectividad en productos específicos como las hamburguesas⁽²⁾.

Por lo tanto, este estudio tuvo como objetivo evaluar y comparar el efecto de la adición de nisina, lactatos y acetato-lactato sobre el crecimiento de patógenos como *Escherichia coli* y de microorganismos contaminantes naturales en la carne, así como sobre parámetros de calidad y vida de anaquel de la carne molida de res mantenida en refrigeración.

products^(9,10,11,12). Lactates exhibit antimicrobial properties against non-pathogenic⁽¹³⁾ and pathogenic⁽¹⁴⁾ microorganisms.

Both lactates and acetates have been used to improve cured and cooked meat product quality, but very few reports are available on their use in raw meat^(15,16). In an effort to improve meat product quality and shelf-life, a number of studies describe use of nisin alone or in combination with other natural products such as essential oils and spices^(17,18,19), as well as lactates and acetates for pathogen inhibition^(16,20,21). However, very limited research has been done comparing the action of nisin to those of lactates and acetates in beef patties. These natural preservatives are widely used in meat products in other countries but their use in Mexico is limited due to a lack of data on their effectiveness in specific products, such as beef patties⁽²⁾.

The present study objective was to evaluate and compare the effect of nisin, sodium lactate, potassium lactate and acetate-lactate on growth in pathogens such as *Escherichia coli* and natural contaminating microorganisms, as well as on quality parameters and shelf-life in ground beef stored under refrigeration.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was implemented in two stages, both involving beef patties. In the first, the effect of the studied antimicrobials on *E. coli* growth, color and pH in previously inoculated patties was determined. In the second, the effect of the same antimicrobials on growth of natural microbiota, as well as patty color, pH and sensory properties was evaluated.

Beef patty preparation

The patties were made from shoulder cuts (infraspinatus, supraspinatus, subscapularis and teres major) purchased from a local butcher 24 h after slaughter at the municipal slaughterhouse in Netzahualcóyotl, State of

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se dividió en dos etapas; la primera se concentró en determinar el efecto de diferentes antimicrobianos sobre el crecimiento de *E. coli*, color y pH en hamburguesas elaboradas con carne de res previamente inoculadas. En la segunda etapa se evaluó el efecto de los mismos antimicrobianos sobre la microbiota natural, el color, el pH y las propiedades sensoriales de hamburguesas de carne de res.

Elaboración de las hamburguesas

Para la elaboración del producto cárnico se utilizaron músculos de la espaldilla (infraespinoso, supraespinoso, subescapular y redondo mayor) de canal bovina, adquirida en un obrador local después de 24 h desde la matanza realizada en el rastro municipal de Netzahualcóyotl. La carne refrigerada a 4 °C se limpió, se eliminó la mayoría del tejido conectivo externo, así como el excedente de grasa, para posteriormente cortarla en trozos más pequeños y así facilitar su molienda. Con el músculo ya limpio y en pequeños pedazos, se procedió a la molienda en un molino (Torrey M32-3 Monterrey, NL, México) con un cedazo de 3 mm. Posteriormente, las hamburguesas, de 100 g cada una, fueron moldeadas, y asignadas a cinco tratamientos.

Diseño de los experimentos

Los antimicrobianos con acción dependiente del ácido láctico fueron suministrados por PURAC México, S de RL de CV (México, DF) y el antimicrobiano a base de nisina, ácidos orgánicos (láctico, sórbico y cítrico) y propilparabeno por la empresa Ingreditech México, representante de Chemital, S.A. España. Cada tratamiento constó de 30 hamburguesas en total: 1) testigo, sin la adición de antimicrobianos (T); 2) adición con 0.3% (p/p) de producto comercial con nisina (INBAC® 10-NA) en polvo (N), el producto comercial contenía 0.05% de nisina y se añadió directamente a la carne durante el mezclado de la hamburguesa,

Mexico, Mexico. Stored under refrigeration (4 °C), the beef was trimmed, eliminating most of the external connective tissue and excess fat, and then cut into smaller chunks to facilitate grinding. These cuts were grounded using a meat grinder (Torrey M32-3 Monterrey, Nuevo Leon, Mexico) with a 3 mm grinding plate. Samples (100 g) of ground beef were molded into patties and each patty assigned to one of five treatments.

Experimental design

Antimicrobials with lactic acid-dependent action were supplied by PURAC México, S. de R.L. de C.V. (Mexico, DF, Mexico), and the nisin, organic acids (lactic, sorbic and citric) and propylparaben by Ingreditech México (representing Chemital, S.A., Spain). Each treatment consisted of 30 patties: 1) control with no added antimicrobials [C]; 2) 0.3% (p/p) powdered commercial nisin (0.5% nisin content; INBAC® 10-NA)[N] added directly to beef when grinding, pH was 5.0 to 5.5 after addition; 3) 3% (v/p) liquid sodium lactate (60%, PURASAL® S) [NaL]; 4) 3% liquid potassium lactate (78%, PURASAL® HiPure P Plus) [KL]; and 5) 1% (v/p) powdered acetate-lactate (PURASAL® Powder XTend) previously dissolved in water at 4 °C [AL].

The antimicrobials were added to the ground beef, mixed for 3 min in a Kitchen Aid Classic (model MK456PWH, Michigan, USA) and stored at 4 °C. After preparation, patties were placed on polystyrene foam trays (BIP Plastics, State of Mexico, Mexico) and covered with oxygen-permeable (1.742 cm³ im/ m²d kPa at 23 °C and 95% HR), low density polyethylene film (Kleen pack, Kimberly-Clark de México). The trays were then stored under refrigeration (4 °C) until analysis were performed.

Stage 1

Before addition of the antimicrobials, the ground beef was inoculated with 300 µl *Escherichia coli* (JM P101; 3.6 x 10⁸ CFU/ml; donated by Queen's University, Belfast, Northern Ireland, UK) activated in trypticasein soy broth (TSB;

que presentó pH de 5.0 a 5.5 después de adición del antimicrobiano; 3) adición de 3% (v/p) de lactato de sodio al 60% en presentación líquida (PURASAL® S) (LNa); 4) adición de 3% (v/p) de lactato de potasio al 78% en presentación líquida (PURASAL® HiPure P Plus) (LK); 5) adición de 1% (v/p) de acetato-lactato en presentación en polvo previamente disuelto en agua a 4 °C (PURASAL® Powder XTend) (AL).

Los antimicrobianos fueron añadidos a la carne molida y mezclados por un tiempo de 3 min en una Kitchen Aid Classic (modelo MK456PWH Michigan, USA) manteniéndose la temperatura a 4 °C. Posterior a la preparación, las hamburguesas se colocaron en bandejas de unigel (BIP Plastics, Estado de México, México) y cubiertas con película estirable de polietileno de baja densidad (LDPE) (Kleen pack, Kimberly-Clark de México), permeable al oxígeno (permeabilidad al oxígeno 1.742 cm³ im/ m²d kPa a 23 °C y 95% HR) y almacenadas en refrigeración a 4 °C en una cámara de refrigeración hasta la realización de los análisis.

Etapa 1

En esta etapa, se inocularon las hamburguesas con 300 µl de un cultivo de *Escherichia coli* (JM P101), activado en caldo soya tripticaseina (TSB) (Difco Laboratories, Michigan, USA), donado por la Queen's University of Belfast (Northern Ireland, UK), a una concentración de 3.6 x 10⁸ UFC/ml, previamente a la adición de los antimicrobianos a la carne molida (100 g).

Posteriormente se añadieron los antimicrobianos acorde con los procedimientos y tratamientos ya descritos. Las hamburguesas se colocaron en bandejas de unigel, cubiertas con película estirable y almacenadas a 4 °C por ocho días, realizando muestreos durante los días 2, 4, 6 y 8. Las muestras se analizaron para conteo de *E. coli*, color y pH.

El conteo de *E. coli* se realizó en placas con medio selectivo agar EMB (eosina azul de metileno, Difco Laboratories, Michigan, USA) con incubación a 35 °C por 24 h. El color se

Difco Laboratories, Michigan, USA). The antimicrobials were then added as described previously, in the corresponding treatments. The patties were stored as described above for 8 d and samples taken at 2, 4, 6 and 8 d. These were analyzed for *E. coli* count, and patty color and pH.

Counts were done using plates containing eosin-methylene blue (EMB) selective agar medium (Difco Laboratories, Michigan, USA) after incubation at 35 °C for 24 h. Color was evaluated with a colorimeter (11491 Color Flex, Hunter Lab, Reston, Virginia, USA) using D65 illuminant and a 10° observation angle. Values were generated for CIE (L*, a* and b*), and samples analyzed in triplicate. Measurements were made of pH by homogenizing a 10 g sample in 90 ml distilled water and filtering the mixture to remove connective tissue. Filtrate pH was measured with a potentiometer (Beckman pH 50, Palo Alto, California, USA) previously calibrated with pH 7 and pH 4 buffer solutions.

Stage 2

Antimicrobials were added to the ground beef, and patties prepared and stored as described above. Samples were taken at 2, 4, 6, 8 and 10 d and analyses run to identify total coliform bacteria, aerobic bacteria, pH and color (L*, a*, b*). In addition, a sensory evaluation was done after one day in refrigerated storage.

Evaluation of mesophilic aerobic bacteria was done by making decimal dilutions of sample in 0.1% peptonized water and then incubating on standard count agar (Bacto Plate Count Agar, Difco, Laboratories, Michigan, USA) at 35 ± 2 °C for 48 ± 2 h⁽²²⁾. Total coliforms were evaluated by incubation on red-violet-bile-lactose agar (RVBA, Difco Laboratories, Michigan, USA) at 35 °C for 24 ± 2 h⁽²³⁾. Results were expressed as log₁₀ UFC/g. Values for pH and color were measured as described in Stage 1.

For the sensory evaluation, the patties were cooked until reaching a 70 °C internal

evaluó con un colorímetro Hunter Lab modelo 11491, *Color Flex* (Reston, Virginia) con iluminante D65 y 10° de ángulo de observación y se obtuvieron los valores de CIE L*, a* y b* con muestras analizadas por triplicado.

Para la medición del pH, 10 g de muestra se homogeneizaron en 90 ml de agua destilada; posteriormente, la mezcla se filtró para eliminar el tejido conectivo y finalmente se midió el pH del filtrado en un potenciómetro Beckman modelo pH 50, previamente calibrado con soluciones amortiguadoras pH 7 y pH 4 (Palo Alto California, USA.).

Etapa 2

Las hamburguesas se adicionaron con los antimicrobianos y almacenadas según los mismos tratamientos descritos. Cada dos días se determinó la presencia de coliformes totales, mesófilos aerobios, pH y color (L*, a*, b*). Las hamburguesas también se evaluaron sensorialmente después de 1 día de almacenamiento en refrigeración.

La evaluación de mesófilos aerobios se realizó por diluciones decimales de la muestra en agua peptonada al 0.1% y después se incubaron en agar cuenta estándar (Bacto Plate Count Agar, Difco, Laboratories, Michigan, USA) a 35 ± 2 °C por 48 ± 2 h⁽²²⁾. La evaluación de coliformes totales se realizó en agar-rojo-violeta-bilis-lactosa (RVBA, Difco Laboratories, Michigan, USA) con incubación a 35 °C durante 24 ± 2 h⁽²³⁾. Los resultados se expresaron en log₁₀ UFC/g. El pH y el color se analizaron según lo descrito en la Etapa 1.

Para la evaluación sensorial, las hamburguesas se cocinaron⁽²⁴⁾ hasta alcanzar una temperatura interna de 70 °C y se cortaron en fracciones de 2 x 2 cm. La evaluación sensorial de aceptación de las hamburguesas se llevó a cabo con un panel de cincuenta panelistas no entrenados, compuesto por 30 hombres y 20 mujeres, con un rango de edad de los 17 a los 40 años y que evaluaron las propiedades de sabor, textura y aspecto general. La prueba sensorial se basó

temperature and then cut into approximately 2 x 2 cm squares. Sensory acceptance was determined with a panel of 50 (30 men: 20 women; 17-40 yr of age) untrained judges (consumers) who evaluated properties of flavor, texture and general aspect. A seven-point structured hedonic scale was used in which 1 meant "dislike extremely" and 7 "like extremely". Panelists responded using the scale and chose a product based on sensory acceptance level⁽²⁵⁾.

Statistical analysis

Data were analyzed with the SAS ver. 9.1 statistics program (Cary, North Carolina, USA), using the GLM model for analysis of variance among treatments. Class variables (i.e. principal effects) were antimicrobial treatments and storage time in days. The model was $Y = a + b(\text{trt}) + c(\text{days}) + d(\text{trt} \times \text{days}) + \text{error}$. Positive interactions were graphed and negative interactions were collated in a table. Fisher's least significant difference (LSD) (5% significance level) was applied to identify differences between the means. Patty sensory evaluation data were processed with a Kruskal-Wallis test (5% significance level).

RESULTS AND DISCUSSION

Stage 1

No interaction effect was observed for the antimicrobial treatment and storage time. Treatments effects on *E. coli* growth, pH and color were therefore described separately.

The nisin and organic acids treatment had the greatest effect ($P < 0.05$) on growth in *E. coli* after eight days. From the initial concentration (7.03 log₁₀ UFC/g), this treatment lowered mean *E. coli* count to 3.74 log₁₀ CFU/g, representing a mean logarithmic reduction of 3.29 log₁₀ CFU (Table 1). Nisin application on raw meat has also been studied for sanitizing carcass surfaces by spraying⁽²⁶⁾, for decontaminating artificially contaminated pork⁽²⁷⁾, for controlling *S. aureus* and *Salmonella* in pork sausage in combination with 2% sodium lactate⁽²⁸⁾, and as an anti-

en la utilización de la escala hedónica estructurada de siete puntos, en la cual 1 significaba disgusta extremadamente y 7 gusta extremadamente. Con esta escala, el panelista respondió y eligió el producto basándose en los atributos sensoriales de acuerdo a su nivel de agrado⁽²⁵⁾.

Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se empleó el programa estadístico SAS versión 9.1 (Cary, North Carolina, USA) haciendo uso del modelo GLM para el análisis de varianza entre los diferentes tratamientos aplicados. Las variables de clase (efectos principales) fueron tratamientos antimicrobianos y días de almacenamiento. El modelo utilizado fue el siguiente: $Y = a + b (trt) + c (días) + d (trt*días) + error$. Cuando la interacción fue positiva se graficaron los resultados y en el caso de interacciones negativas se presentaron exclusivamente en forma de cuadro los efectos principales. Las medias fueron discriminadas por el procedimiento de la diferencia mínima

Cuadro 1. Conteo medio de *E. coli*, reducción logarítmica media de *E. coli* y valor medio de pH en las hamburguesas adicionadas con diferentes antimicrobianos después de 8 días en refrigeración (4 °C)

Table 1. Mean *E. coli* count, mean logarithmic reduction in *E. coli* and mean pH values after 8 d under refrigeration (4 °C) for beef patties containing added natural antimicrobials

Treatment	Logarithmic reduction		Logarithmic reduction		pH
	<i>E. coli</i> (log ₁₀ CFU/g)	SE	<i>E. coli</i> (log ₁₀ CFU/g)	SE	
C	7.20 ^a	0.23	-0.17	0.11	6.99 ^a
N	3.74 ^d	0.23	3.29	0.11	5.34 ^c
NaL	5.43 ^b	0.23	1.6	0.11	6.04 ^b
KL	4.70 ^c	0.23	2.33	0.11	6.09 ^b
AL	5.76 ^b	0.23	1.27	0.11	5.96 ^b

a,b,c,d Different letter superscripts in the same column indicate significant difference (P<0.05).

C= control; N= nisin; NaL= sodium lactate; KL= potassium lactate; AL= acetate-lactate. SE= Standard error.

Listeria agent on raw meat in combination with 2% sodium chloride⁽²⁹⁾.

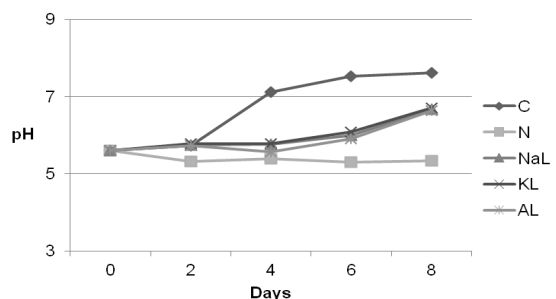
Potassium lactate (KL) exhibited an intermediate efficiency, reducing *E. coli* counts by 2.33 log₁₀ CFU/g. The NaL and AL treatments had no inhibitory effect (P>0.05), reducing *E. coli* counts by only slightly more than 1 log₁₀ CFU/g (Table 1). All these levels are higher than the reduction (1.11 log₁₀ CFU/g) reported for a combination of peroxyacetic acid (200 ppm) and potassium lactate (3%) in raw meat stored for 7 d in refrigeration⁽²¹⁾.

The different treatments' preservative effect was also evident in their pH values during storage. The nisin treatment maintained pH below 5.5 throughout the experimental period whereas the remaining treatments allowed pH to increase slightly to 6.6 to 6.7 by d 8 (Figure 1). However, all the treatments kept pH at levels lower (P<0.05) than the control treatment (pH 7.61). Given that pH is a spoilage indicator in beef, the treatments evaluated here all retarded spoilage, maintaining pH below 6.0 up to at least d 6 under refrigeration.

Color parameters (L*, a*, b*) in the *E. coli*-inoculated patties, generally tended to decrease

Figura 1. Cambios de pH en las hamburguesas inoculadas con *E. coli* y adicionadas con antimicrobianos a lo largo de 8 días almacenadas a 4 °C

Figure 1. Changes in pH in beef patties inoculated with *E. coli* and containing added natural antimicrobials, during 8 d under refrigeration (4 °C)



C= control; N= nisin; NaL= sodium lactate; KL= potassium lactate; AL= acetate-lactate.

significativa (LSD) de Fisher con nivel de significancia de 5%.

Para el análisis de los datos obtenidos de la evaluación sensorial de las hamburguesas en la Etapa 2 se utilizó el modelo Kruskal-Wallis Test con nivel de significancia de 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primera Etapa

En la primera etapa del estudio no se observó efecto de la interacción del tratamiento antimicrobiano y los días en almacenamiento sobre los parámetros evaluados, siendo así presentados los efectos independientes de los tratamientos sobre el crecimiento de *E. coli*, pH y color.

Se observó mayor control del crecimiento de *E. coli* ($P < 0.05$) con el tratamiento de nisina y ácidos orgánicos después de ocho días en refrigeración, el cual presentó un conteo medio de $3.74 \log_{10}$ UFC/g. Considerando el conteo inicial de *E. coli* en las hamburguesas antes del almacenamiento (tiempo 0 días) de $7.03 \log_{10}$ UFC/g, el tratamiento con nisina proporcionó una reducción logarítmica media de $3.29 \log_{10}$ UFC (Cuadro 1).

En carne fresca, ha sido estudiada la aplicación de nisina en canales rociadas para sanitizar su

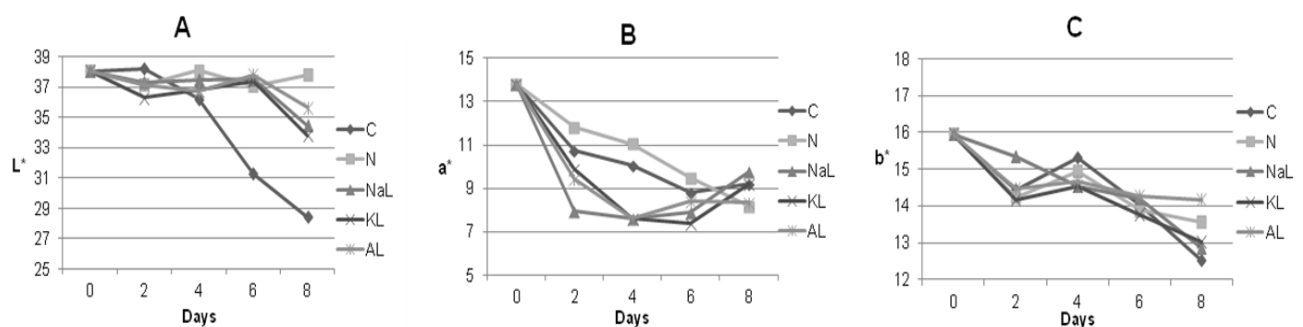
in value. The one exception was L^* in the nisin treatment, which remained largely constant and higher ($P < 0.05$) than in the other treatments throughout the experimental period (Figure 2). The NaL, KL and AL treatments maintained higher L^* values than the control. Red (a^*) diminished in intensity throughout the experimental period in all the treatments⁽⁹⁾. This decline was less pronounced in the nisin treatment, which had the highest ($P < 0.05$) a^* value. These results agree with the declines in a^* reported in a study in which potassium lactate, sodium metasilicate, peracetic acid and acidified sodium chloride were added to ground beef⁽¹¹⁾. The preservative treatments exhibited higher ($P < 0.05$) a^* values than the control from d 1 to 7 of storage⁽¹¹⁾. In another study, visual and instrumental discoloration were observed over 3 d storage in ground beef with added sodium lactate, potassium lactate and sodium acetate⁽²⁰⁾. A general decline in b^* values was observed throughout the experimental period in all the treatments, which did not differ ($P > 0.05$).

Second Stage

The microbial treatment / storage time interaction affected only pH values in this stage. Coliforms and mesophylic aerobic microorganisms increased in all treatments throughout the

Figura 2. Cambios de los valores de L^* (A), a^* (B) y b^* (C) en hamburguesas inoculadas con *E. coli* adicionadas con antimicrobianos naturales a lo largo de 8 días almacenadas a 4 °C

Figure 2. Changes in values for L^* (A), a^* (B) and b^* (C) in beef patties inoculated with *E. coli* with added natural antimicrobial, during eight days under refrigeration (4 °C)



C= control; N: nisin; NaL= sodium lactate; KL= potassium lactate; AL= acetate-lactate.

superficie⁽²⁶⁾ y para descontaminar carne de cerdo artificialmente contaminada⁽²⁷⁾, combinada con el 2% de lactato de sodio para el control de *S. aureus* y *Salmonella* en salchichas de cerdo⁽²⁸⁾ y combinada con 2% de cloruro de sodio como agente anti listeria en carne molida⁽²⁹⁾.

La adición de LK mostró una eficiencia intermedia, con una reducción de 2.33 log₁₀ UFC/g en el conteo de *E. coli* en relación a su conteo inicial. Los tratamientos LNa y AL fueron los que proporcionaran menor efecto inhibitorio ($P > 0.05$), con reducción del número de *E. coli* superior a 1 log₁₀; Cuadro 1). La inclusión de 200 ppm de ácido peroxiacético y 3% de lactato de potasio a la carne molida de res proporcionó reducción de 1.11 log₁₀ al 7° día de almacenamiento en refrigeración⁽²¹⁾.

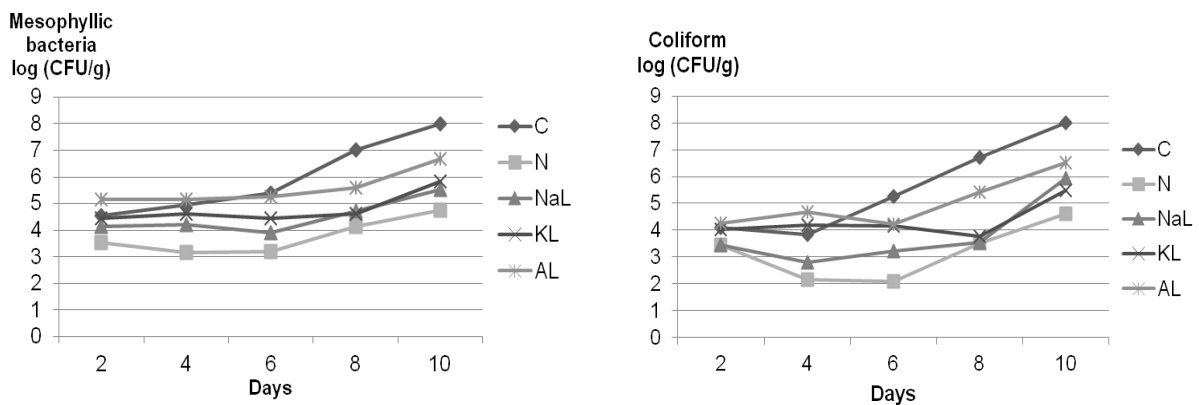
El efecto conservante de la carne en los tratamientos estudiados también puede ser verificado en el pH de las hamburguesas durante el almacenamiento. El tratamiento con nisina mantuvo el pH de la carne debajo del valor 5.5 durante todo el periodo de refrigeración, mientras los demás tratamientos mostraron incremento del pH, alcanzando valores entre

experimental period (Figure 3), but microbial growth was lower in the treatments than in the control at all times. Average microbial growth in the treatments declined from 1.83 log₁₀ CFU/g on d 2 of storage to 1.38 on d 10. In contrast, values for the control ranged from 3.89 to 3.45 log₁₀ CFU/g.

As occurred with *E. coli* growth in Stage 1, the nisin treatment exhibited the best inhibition of natural contaminating bacteria compared to the other treatments ($P < 0.05$). Inhibition of mesophylic aerobic microorganisms, psychrotrophs and *Listeria monocytogenes* increases as nisin concentration rises and storage temperature drops⁽²⁹⁾. Final mesophylic aerobic counts in the antimicrobial treatments was below the 7 log₁₀ CFU/g limit for raw meat⁽³⁰⁾, vs 8 log₁₀ in the control. The KL treatment was the second most efficient at controlling growth in coliforms and was similar to the NaL treatment in inhibiting mesophylic aerobics on d 2 and 10 of storage. This agrees with a study in which addition of 2.5% sodium lactate in pork sausage lowered mesophylic aerobic growth for up to 18 d⁽¹²⁾. Of the treatments, the AL had the lowest ($P < 0.05$) inhibition of coliforms, although it was still higher ($P < 0.05$) than in the control.

Figura 3. Evolución en el conteo de coliformes y mesófilos aerobios en hamburguesas adicionadas con antimicrobianos después de 10 días almacenadas a 4 °C

Figure 3. Coliform and mesophylic aerobic bacteria counts in beef patties containing added natural antimicrobials, during 10 d under refrigeration (4 °C)



C= control; N= nisin; NaL= sodium lactate; KL= potassium lactate; AL= acetate-lactate.

6.6 y 6.7 al final del estudio (Figura 1). Sin embargo, todos los tratamientos demostraron contener más consistentemente el incremento del pH a lo largo del almacenamiento en comparación al tratamiento testigo ($P<0.05$) que finalizó con valor de 7.61. Considerando el pH como un indicador de deterioro de la carne de res, la inclusión de los antimicrobianos a la carne mantuvo el pH en valores menores a 6.0 hasta el 6° día de almacenamiento.

Con relación al efecto de los antimicrobianos sobre las características de color (valores L^* , a^* y b^*) de las hamburguesas inoculadas con *E. coli*, se comprobó que los tratamientos mostraron una tendencia a bajar estos valores, con excepción de la luminosidad en el tratamiento con nisina, que presentó una mayor constancia y mayores valores de L^* ($P<0.05$) en comparación a los demás tratamientos a lo largo del almacenamiento (Figura 2). Los tratamientos LNa, LK y AL mostraron mayor capacidad para mantener los valores de luminosidad (L^*) en relación al tratamiento testigo.

Con respecto a los efectos sobre el color rojo, se observó que la intensidad disminuyó a lo largo del almacenamiento en todos los tratamientos⁽⁹⁾. El que contenía nisina fue el que mostró menor caída, presentando el mayor valor medio de este color ($P<0,05$) durante el almacenamiento.

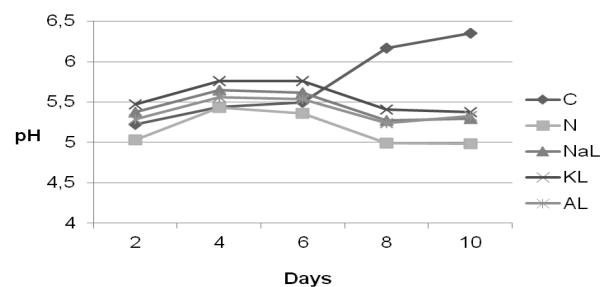
La reducción del color rojo de la carne molida de res adicionada de lactato de potasio, metasilicato de sodio, ácido peracético y cloruro de sodio acidificado fue observada a lo largo de siete días de almacenaje en refrigeración⁽¹¹⁾. Sin embargo, se observó que los tratamientos con los productos conservantes presentaron mayores valores de color rojo ($P<0.05$) en comparación al tratamiento testigo del 1° al 7° día de vida de anaquel⁽¹¹⁾. En carne molida de res adicionada de lactato de sodio, lactato de potasio y acetato de sodio se observó descoloración visual e instrumental a lo largo de tres días de almacenaje⁽²⁰⁾.

This coincides with a report of lactates exercising more inhibition of mesophylic aerobic microorganisms than acetates in refrigerated pork⁽¹⁵⁾. Sodium lactate, sodium acetate and potassium sorbate have been used as lactic acid bacteria inhibitors in cooked cured meat products. Alone or in combination with the other antimicrobials, sodium lactate is reported to effectively extend shelf-life of a cooked cured meat product by up to ten days⁽³¹⁾. Generally, salts from lactic acid, acetic acid and organic acids are known to have antibacterial activity in culture media and food products under laboratory conditions^(32,33,34).

Values for pH declined during storage in all the treatments, but increased ($P<0.05$) in the control. Growth in *E. coli* and mesophylic aerobic microorganisms has also been reported in ground beef stored under refrigeration for seven days, although meat pH became more acidic during storage⁽²¹⁾. In the present study, the nisin treatment produced the lowest ($P<0.05$) pH values, but the treatments still maintained pH below 5.4 at the end of the experimental period (Figure 4). A similarly significant ($P<0.01$) drop in pH compared to controls has been reported in response to application of nisin in ground buffalo meat under refrigeration⁽²⁹⁾.

Figura 4. Efecto de los días de almacenamiento sobre el pH en hamburguesas adicionadas con antimicrobianos después de 10 días almacenadas a 4 °C (Etapa 2)

Figure 4. Values for pH in beef patties containing added natural antimicrobials, during 10 d under refrigeration (4 °C) (Stage 2)



C= control; N= nisin; NaL= sodium lactate; KL= potassium lactate; AL= acetate-lactate.

Para la intensidad de b^* no se encontraron diferencias ($P>0.05$) entre los tratamientos, siendo observada una disminución a lo largo del almacenamiento en todos los tratamientos.

Segunda Etapa

En la segunda etapa, el efecto de la interacción del tratamiento antimicrobiano y los días en almacenamiento fue constatado solamente para el pH. Aunque se observó un incremento en el número de coliformes y aerobios mesófilos para todos los tratamientos durante el almacenamiento (Figura 3), las hamburguesas adicionadas de antimicrobianos presentaron menor incremento en comparación al testigo a lo largo del tiempo de estudio. En las hamburguesas tratadas con antimicrobianos el incremento de coliformes y de mesófilos del 2° al 10° día de almacenamiento fue en promedio de 1.83 y 1.38 \log_{10} UFC/g, respectivamente, vs 3.89 y 3.45 \log_{10} UFC/g en el testigo.

Así como ocurrió en el conteo de *E. coli*, las hamburguesas tratadas con nisina mostraron mejor control del crecimiento de las bacterias contaminantes naturales de la carne en comparación a los demás tratamientos ($P<0.05$). El grado de inhibición de mesófilos, psicrótrofos y *Listeria monocytogenes* aumenta conforme se incrementa la concentración de nisina y se disminuye la temperatura de almacenamiento(29).

Para los mesófilos, el conteo final en las hamburguesas adicionadas de antimicrobianos se encontró abajo del límite recomendado en carnes crudas, máximo 7 \log_{10} UFC/g(30). En el tratamiento testigo, el conteo final de mesófilos alcanzó un valor de 8 \log_{10} UFC/g.

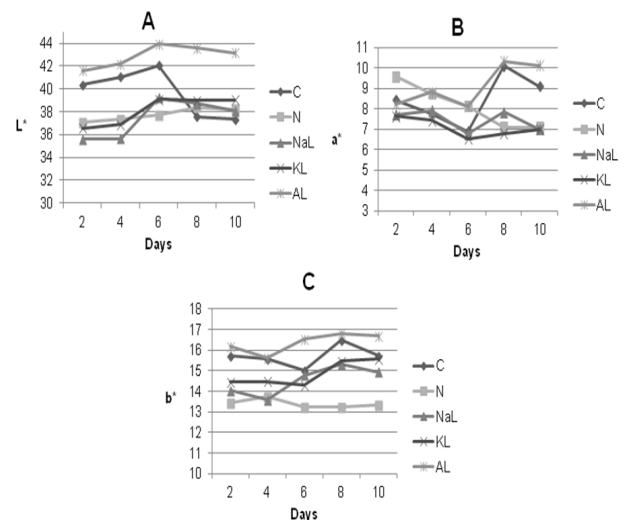
En concordancia con los resultados de la primera etapa del experimento en cuanto a la inhibición de *E. coli*, la adición de LK se mostró como el segundo mejor tratamiento en controlar el crecimiento de coliformes y mostró eficiencia similar al LNa en la inhibición de mesófilos del 2° al 10° día de almacenamiento.

Different levels of sodium lactate can also control pH(31).

As occurred in Stage 1, luminosity (L^*) increased throughout the storage period in the antimicrobial treatments, but decreased in the control (Figure 5). Nisin provided the best stability in L^* , while the other treatments allowed a slight increase at day 10 versus day 2. Addition of AL raised red (a^*) values higher ($P<0.05$) during storage than the other treatments. Unlike in Stage 1, nisin was ineffective at maintaining stability in a^* , which was also the case for the NaL and KL treatments. The effects of lactates on meat color have been widely studied. For example, potassium lactate and calcium lactate are reported to improve meat quality by improving color stability and diminishing metmyoglobin formation(35,36). In other studies, sodium lactate

Figura 5. Cambios en los valores de L^* (A), a^* (B) y b^* (C) de las hamburguesas de carne de res adicionadas con antimicrobianos durante 10 días almacenadas a 4 °C (Etapa 2)

Figure 5. Changes in values for L^* (A), a^* (B) and b^* (C) in samples from beef patties containing added natural antimicrobials, during 10 d under refrigeration (4 °C) (Stage 2)



C= control; N= nisin; NaL= sodium lactate; KL= potassium lactate; AL= acetate-lactate.

La adición de 2.5% de lactato de sodio en salchichas de cerdo disminuyó el crecimiento de aerobios mesófilos hasta por 18 días de almacenamiento⁽¹²⁾.

El tratamiento AL fue el que mostró el menor efecto de inhibición sobre los coliformes en relación a los demás tratamientos ($P<0.05$), aunque haya presentado mayor inhibición de estos contaminantes en comparación al testigo ($P<0.05$). Los lactatos proporcionan mayor control para la inhibición de aerobios mesófilos en comparación a los acetatos en carne de cerdo refrigerada⁽¹⁵⁾.

En el estudio en el cual se utilizó lactato de sodio, acetato de sodio y sorbato de potasio como agentes inhibidores de bacterias lácticas en producto cárnico curado cocido, se observó que el lactato de sodio usado aisladamente o en combinación con los otros antimicrobianos logró extender en diez días, de manera efectiva, la vida de anaquel del producto cárnico curado cocido⁽³¹⁾. En general, varias sales del ácido láctico, acético u otros ácidos orgánicos han demostrado actividad antibacteriana en medios bacteriológicos o productos alimenticios bajo condiciones de laboratorio^(32,33,34).

Por otro lado, se comprobó la reducción del pH a lo largo del almacenamiento para los tratamientos adicionados de antimicrobianos; sin embargo, este parámetro en el tratamiento testigo aumentó ($P<0.05$). Así como en el presente trabajo, también observaron crecimiento de *E. coli* y de aerobios mesófilos en carne molida de res almacenada durante siete días en refrigeración, aunque el pH de la carne se haya tornado más ácido a lo largo del almacenamiento⁽²¹⁾.

El tratamiento con nisina proporcionó los menores valores de pH a las hamburguesas ($P<0.05$). Los demás antimicrobianos también se mostraron eficaces en el mantenimiento del pH por debajo de 5.4 hasta el final del almacenamiento (Figura 4).

solution was shown to maintain red color and lower surface shine, producing the aspect of fresh meat for longer^(10,36,37). However, some authors claim that the effect of sodium lactate on color in raw beef and pork is limited^(15,20). In the present study, yellow (b^*) values were stable throughout the study period in all treatments with no differences ($P>0.05$) between analysis days.

The most important food sensory characteristics - texture, flavor, aroma, color, palatability⁽³⁸⁾ - can vary by meat type. Consumers identify texture and softness as the most important sensory attributes in meat⁽³⁹⁾. The beef patties evaluated here exhibited general acceptance for all the evaluated attributes (Table 2), with scores of at least "like moderately". Nisin treatment patties had the lowest flavor scores ($P<0.05$). In contrast, the KL, NaL and AL treatments had scores similar to that of the control. For texture, the control had the highest scores, although these were not different ($P>0.05$) from those of KL and AL. These were followed by the nisin treatment and finally the NaL treatment, with the lowest ($P<0.05$) texture scores. These results generally agree with those of a previous study in which texture scores were highest in patties treated with potassium lactate (3%), peroxyacetic acid (0.02%) and acidified sodium

Cuadro 2. Notas atribuidas en la evaluación sensorial de aceptación para sabor, textura y aspecto general de las hamburguesas adicionadas con antimicrobianos

Table 2. Sensory acceptance scores for flavor, texture and general aspect of beef patties containing added natural antimicrobials

Treatment	Flavor	Texture	General aspect	SE
Control	5.10 ^a	5.04 ^a	5.04 ^a	0.17
Nisin	4.28 ^b	4.56 ^{bc}	4.20 ^b	0.17
Sodium lactate	5.08 ^a	4.44 ^c	4.90 ^a	0.17
Potassium lactate	5.00 ^a	4.66 ^{ab}	4.92 ^a	0.17
Acetate-lactate	4.90 ^a	4.66 ^{ab}	4.92 ^a	0.17

a,b,c Different letter superscripts in the same column indicate significant difference ($P<0.05$). SE= Standard error.

La aplicación de nisina en muestras de carne molida de búfalo logró una disminución significativa ($P < 0.01$) del pH en comparación con las muestras testigo a temperatura de refrigeración⁽²⁹⁾. En un estudio en el que empleó lactato de sodio a diferentes concentraciones, se observó el buen control del pH durante el periodo de análisis⁽³¹⁾.

En cuanto a los parámetros de color y luminosidad, en esta segunda etapa se comprobó un ligero aumento de los valores de L^* a lo largo del almacenamiento para los tratamientos con antimicrobianos (Figura 5). Sin embargo, así como ocurrió en la primera etapa, el tratamiento testigo mostró una disminución de la luminosidad a lo largo del almacenamiento. El tratamiento adicionado de nisina fue el que mostró mejor estabilidad en los valores de luminosidad durante el almacenaje, mientras los demás tratamientos presentarían ligero incremento de los valores medios de luminosidad al final de 10 días de almacenamiento en relación al 2º día.

La adición de AL aumentó los valores de a^* (rojo) durante el almacenamiento ($P < 0.05$). Sin embargo, en esta etapa, la adición de nisina no se mostró efectiva en la estabilidad del color rojo de las hamburguesas como en la primera etapa, habiendo una ligera caída de los valores de a^* durante el almacenamiento. Para los lactatos (de sodio y de potasio) también se verificó menor caída de los valores de a^* durante el almacenaje en relación al tratamiento con nisina.

Hay muchos estudios sobre el efecto de los lactatos sobre el color de la carne. El lactato de potasio y lactato de calcio mejoran la calidad de la carne al incrementar la estabilidad del color y disminuir la formación de metamioglobina^(35,36). El tratamiento de la carne de res con solución de lactato de sodio estabilizó el color rojo y disminuyó el brillo superficial de la carne, proporcionándole aspecto de carne fresca por más tiempo^(10,36,37). Sin embargo, algunos autores afirman que el efecto del lactato de

chloride, but without preservatives⁽¹¹⁾. This suggests that the effect of antimicrobials on particle size in ground beef needs to be considered before offering it to consumers.

In terms of general patty aspect, the lowest ($P < 0.05$) score was observed in the nisin treatment, perhaps due to the substantial drop in a^* during storage in this treatment. Again, those with added KL or AL, and no added antimicrobials, had the highest scores. Addition of potassium lactate to pork and beef is known to improve sensory attributes⁽¹⁰⁾, and addition of lactate and vinegar to pork patties is reported to increase sensory acceptance, juiciness and shelf-life compared to a control⁽¹²⁾.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

All the tested antimicrobials exhibited an inhibitory effect against enterobacteria and aerobic mesophilic bacteria *versus* the control treatment. The nisin treatment provided the best microbiological protection, effectively controlling contaminating microorganisms and pH without significantly altering meat color. However, this treatment did affect sensory acceptance compared to treatments containing only added lactates. The tested antimicrobials do provide protection against microorganisms and therefore extend shelf-life. Future research should address how to include these in meat products to provide microbial stability while improving sensory acceptance.

ACKNOWLEDGEMENTS

The research reported here was financially supported by the UNAM DGPA via Line 5 (Desarrollo De Nuevos Productos) of the macroproject "Productividad Sostenible de los Hatos de Cría en Pastoreo".

End of english version

sodio en el color de la carne cruda de res y de cerdo es limitado^(15,20). Los valores de b^* (amarillo) se mantuvieron estables durante el almacenamiento en todos los tratamientos, no existiendo diferencia ($P>0.05$) entre los diferentes días de análisis en los tratamientos.

Las características sensoriales de los alimentos más importantes para el consumidor, que incluyen textura, sabor, aroma y color⁽³⁸⁾ pueden variar de acuerdo al tipo de carne, particularmente la palatabilidad. El consumidor ha identificado a la textura y la suavidad como los atributos sensoriales más importantes de la carne⁽³⁹⁾.

El Cuadro 2 muestra que, de manera general, las hamburguesas evaluadas mostraron aceptación para todos los atributos evaluados, pues obtuvieron notas correspondientes a la descripción "gusta regularmente" en la escala sensorial de aceptación utilizada.

Las hamburguesas del tratamiento con nisina obtuvieron la menor calificación ($P<0.05$) para el sabor por parte de los panelistas. Respecto al sabor, las hamburguesas de los tratamientos LK, LNa y AL mostraron aceptabilidad semejante a las del testigo.

En cuanto a la textura, el tratamiento testigo mostró los mayores valores y preferencia, semejante a la de los tratamientos LK y AL. Las hamburguesas adicionadas de LNa obtuvieron las calificaciones más bajas ($P<0.05$) entre los tratamientos; las hamburguesas con nisina mostraron valores intermedios.

En la evaluación sensorial de hamburguesas tratadas con lactato de potasio (3%), ácido peroxiacético (0.02%) y cloruro de sodio acidificado (0.1%), las calificaciones de textura de las hamburguesas sin los conservadores fueron más altas⁽¹¹⁾. El efecto de los antimicrobianos sobre el tamaño de las partículas de la carne molida de res debe ser considerado cuando la carne es expuesta al consumidor.

En lo que respecta al aspecto general de las hamburguesas, el tratamiento antimicrobiano con la menor calificación por parte del grupo de panelistas fue el que contenía nisina ($P<0.05$). Esta observación puede obedecer a la reducción del componente de color a^* durante el almacén de las muestras.

De acuerdo a los atributos evaluados sensorialmente, las hamburguesas sin adición de antimicrobianos y adicionadas con LK y AL fueron las de mayor aceptación por los panelistas. La adición de lactato de potasio en la carne de cerdo y de res puede mejorar sus atributos sensoriales⁽¹⁰⁾

La adición de lactato y vinagre a hamburguesas de carne de cerdo incrementó la aceptación sensorial, la jugosidad y la vida de anaquel de los productos en comparación al testigo⁽¹²⁾.

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

Todos los antimicrobianos estudiados mostraron un efecto de inhibición de enterobacterias y mesófilos en comparación al testigo. El tratamiento con nisina fue el que proporcionó la mejor protección microbiológica al producto cárnico con acción efectiva sobre los microorganismos contaminantes y el pH, sin causar alteración significativa en el color de la carne. Sin embargo, la adición de nisina afectó negativamente la aceptación sensorial de las hamburguesas en comparación a los lactatos. Estos resultados mostraron que los antimicrobianos estudiados pueden conferir protección extra al procesado cárnico y extender su vida de anaquel, sirviendo de base para futuros estudios en la obtención de un producto cárnico con adecuada estabilidad microbiana y elevada aceptación sensorial.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo financiero ofrecido por la DGPA da la UNAM a través de la línea 5

(Desarrollo De Nuevos Productos) del Macro proyecto intitulado Productividad Sostenible de los Hatos de Cría en Pastoreo.

LITERATURA CITADA

- Anetif. Asociación Nacional de Establecimientos TIF, A.C. México: Excelencia de Productos Cárnicos para el Mundo. [en línea]. http://www.anetif.org/promocional_carnicos/index.html. 2012. Consultado 17 May, 2012.
- Castillo RM, Pérez AJ, Cañas AO, Moreno G, Santiago M, Chavez JL, Maqueda P. Adición de conservadores naturales en jamón cocido, rebanado y empacado al vacío [resumen]. IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Veracruz, Ver. 2001.
- Garriga M, Aymerich MT, Costa S, Monfort JM, Hugas M. Bacterias lácticas para evitar la viscosidad en productos cárnicos cocidos loncheados. Un ejemplo de bioprotección. Eurocarne 2001;(96):67-71.
- Yang R, Ray R. Prevalence and biological control of bacteriocin-producing psychrotrophic leuconostocs associated with spoilage of vacuum-packaged processed meats. J Food Prot 1994;(57):209-217.
- United States Department of Agriculture, F.S.I.S. Regist F. editor. 1993;(58):4067-4070.
- European Parliament and of the Council. European Directive 95/2/ CE Food additives other than colors and sweeteners. Official Journal. 1995;(L61):1-40.
- Aymerich T, Picouet PA, Monfort JM. Decontamination technologies for meat products. Meat Sci 2008;(78)114-129.
- Bedie GK, Samelis J, Sofos JN, Belk KE, Scanga JA, Smith GC. Antimicrobials in the formulation to control *Listeria monocytogenes* postprocessing contamination on frankfurters stored at 4°C in vacuum packages. J Food Prot 2001;(64):1949-1955.
- Tan WY, Shelef LA. Effects of sodium chloride and lactates on chemical and microbiological changes in refrigerated and frozen fresh ground pork. Meat Sci 2002;(62):27-32.
- Knock RC, Seyfert M, Hunt MC, Dikeman ME, Mancini RA, Unruh JA, Higgins JJ, Monderen RA. Effects of potassium lactate, sodium chloride, sodium tripolyphosphate, and sodium acetate on colour, colour stability, and oxidative properties of injection-enhanced beef rib steaks. Meat Sci 2006;(74):312-318.
- Quilo SA, Pohlman FW, Brown AH, Crandall PG, Dias-Morse PN, Baublits RT, Aparicio JL. Effects of potassium lactate, sodium metasilicate, peroxyacetic acid, and acidified sodium chlorite on physical, chemical, and sensory properties of ground beef patties. Meat Sci 2009;(82)44-52.
- Bradley EM, Williams JB, Schilling MW, Coggins PC, Crist C, Yoder S, Campano SG. Effects of sodium lactate and acetic acid derivatives on the quality and sensory characteristics of hot-boned pork sausage patties. Meat Sci 2011;(88):145-150.
- Chen N, Shelef LA. Relationship between water activity, salts of lactic acid, and growth of *Listeria monocytogenes* in a meatmodel system. J Food Prot 1992;(55):574-578.
- Miller RK, Acuff GR. Sodium lactate affects pathogens in cooked beef. J Food Sci 1994;(59):15-19.
- Jensen, JM, Robbins KL, Ryan KJ, Homco-Ryan C, McKeith FK, Brewer MS. Effects of lactic and acetic acid salts on quality characteristics of enhanced pork during retail display. Meat Sci 2003;(63):501-508.
- Sallam KI, Samejima K. Microbiological and chemical quality of ground beef treated with sodium lactate and sodium chloride during refrigerated storage. LWT 2004;(37):865-871.
- Fang TJ, Tsai HC. Growth patterns of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef treated with nisin, chelators, organic acids and their combinations immobilized in calcium alginate gels. Food Microbiol 2003;(20):243-253.
- Solomakos N, Govaris A, Koidis P, Botsoglou N. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *E. coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. Meat Sci 2008;(80):159-166.
- Saldaña G, Monfort S, Condón S, Raso J, Álvarez I. Effect of temperature, pH and presence of nisin on inactivation of *Salmonella Typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 by pulsed electric fields. Food Res Int 2012;(45):1080-1086.
- Seyfert M, Hunt MC, Ahnstrom ML, Johnson DE. Efficacy of lactic acid salts and sodium acetate on ground beef colour stability and metmyoglobin-reducing activity. Meat Sci 2007;(75):134-142.
- Quilo SA, Pohlman FW, Dias-Morse PN, Brown Jr AH, Crandall PG, Story RP. Microbial, instrumental color and sensory characteristics of inoculated ground beef produced using potassium lactate, sodium metasilicate or peroxyacetic acid as multiple antimicrobial interventions. Meat Sci 2010;(84):470-476.
- NOM-092-SSA1-1994 Norma Oficial Mexicana Bienes y Servicios. Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa. Mexico, SSA (Ed.). 1994.
- NOM-113-SSA1-1994 Norma Oficial Mexicana Bienes y Servicios. Método para la Cuenta de Microorganismos Coliformes Totales en Placa. Mexico, SSA (Ed.). 1994.
- AMSA. American Meat Science Association. Guidelines for cooking sensory evaluation of meat. Chicago, USA: AMSA; 1995.
- Meilgaard M, Civille CV, Carr BT. Sensory evaluation techniques. 3rd ed. Boca Raton, USA: CRC Press; 1999.
- Cutter CN, Siragusa GR. Efficacy of organic acids against *Escherichia coli* O157:H7 attached to beef carcass tissue using a pilot scale model carcass washer. J Food Prot 1994;(57):97-103.
- Murray M, Richard JA. Comparative study of the antilisterial activity of nisin and pediocin AcH in fresh ground pork stored aerobically at 5 °C. J Food Prot 1997;(60):1534-1540.
- Scannell AGM, Hill C, Buckley DJ, Arendt EK. Determination of the influence of organic acids and nisin on shelf-life and microbiological safety aspects of fresh pork sausage. J Appl Microbiol 1997;(83):407-412.
- Pawar DD, Malik SVS, Bhilegaonkar KN, Barbuddhe SB. Effect of nisin and its combination with sodium chloride on the survival of *Listeria monocytogenes* added to raw buffalo meat mince. Meat Sci 2000;(56):215-219.
- ICMSF. International Commission for the Microbiological Specifications of Foods. Microorganisms in foods 7. Microbiological testing in food safety management. 1st ed. NY, USA: Springer; 2002.

31. Drosinos EH, Marios M, Aikaterini K, Dimitrios KIM. Inhibitory effect of organic acid salts on spoilage flora in culture medium and cured cooked meat products under commercial manufacturing conditions. *Meat Sci* 2006;(73):75-81.
32. Mbandi E, Shelef LA. Enhanced inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* in meat by combinations of sodium lactate and diacetate. *J Food Prot* 2001;(64):640-644.
33. Samelis J, Bedie GK, Sofos JN, Belk KE, Scanga JA, Smith GC. Control of *Listeria monocytogenes* with combined antimicrobials after postprocess contamination and extended storage of frankfurters at 4°C in vacuum packages. *J Food Prot* 2002;(65):299-307.
34. Seman DL, Borger AC, Meyer JD, Hall PA, Milkowski AL. Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* in cured ready-to-eat meat products by manipulation of sodium chloride, sodium diacetate, potassium lactate, and product moisture content. *J Food Prot* 2002;(65):651-658.
35. Lawrence TE, Dikeman ME, Hunt MC, Kastner CL, Johnson DE. Effects of enhancing beef *longissimus* with phosphate plus salt, or calcium lactate plus non-phosphate water binders plus rosemary extract. *Meat Sci* 2004;(67):129-137.
36. Mancini RA, Hunt MC, Hachmeister KA, Seyfert M, Kropf DH, Johnson DE, Cusick S, Morrow C. The utility of lactate and rosemary in beef enhancement solutions: effects on *longissimus* color changes during display. *J Muscle Foods* 2005;(16):27-36.
37. Kim Y, Hunt MC, Mancini RA, Kropf D, Smith JS. Metmyoglobin reduction through lactate-NAD-LDII system *in vivo* and *in vitro*. [resumen]. 51st ICoMST. Baltimore, MD, USA. 2005.
38. Aktas N, Kaya M. The influence of marinating with weak organic acids and salts on the intramuscular connective tissue and sensory properties of beef. *Eur Food Res Technol* 2001;(213):88-94.
39. Boleman SJ, Boleman SL, Bidner TD, McMillin KW, Monlezun CJ. Effects of postmortem time on calcium chloride injection on beef tenderness and drip, cooking, and total loss. *Meat Sci* 1995;(39):35-41.