

CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE UN PRODUCTO FORMULADO CON CARNE DE POLLO DESHUESADA MECÁNICAMENTE, PLASMA Y GLÓBULOS ROJOS DE BOVINO

Microbiological Quality of a Meat Product Formulated With Mechanically Deboned Poultry Meat, Plasma and Bovine Red Cells

Betty Benítez¹, Anangelina Archile¹, Yasmína Barboza², Lisbeth Rangel¹, Kenna Ferrer¹ y Mariela Bracho¹

¹Facultad de Medicina. Escuela de Bioanálisis. La Universidad del Zulia.

²Facultad de Medicina. Escuela de Nutrición y Dietética. La Universidad del Zulia. Maracaibo, estado Zulia.

Tel: (02617) 490916- (0416) 3678683- Fax: 02617 597224. E-mail: benitezbetty70@hotmail.com.

RESUMEN

La sangre de bovino y la carne de pollo deshuesada mecánicamente (CPDM) son subproductos alimenticios que debido a su bajo costo y alto valor nutricional son atractivos para la formulación de productos cárnicos. No obstante, su composición química los convierte en excelentes cultivos para el crecimiento microbiano. El objetivo de esta investigación fue evaluar la calidad microbiológica de un producto cárnico formulado con CPDM, plasma y glóbulos rojos de bovino. El embutido fue rebanado, una porción fue almacenada (5°C) con empaque normal y otra porción al vacío. El análisis microbiológico se realizó los días 0, 7, 14, 21, 28 y 35, determinándose recuento de aerobios mesófilos (RAM), coliformes totales (CT), *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*; para el empaque al vacío se determinó además el recuento de bacterias ácido lácticas. Para el producto empaqueado al vacío el RAM estuvo dentro de la normativa hasta 28 días de almacenamiento, para el producto con empaque normal el recuento excedió la norma en el día 14. *E. coli* y *S. aureus* estuvieron ausentes en los tratamientos estudiados, mientras que se observó crecimiento de CT en los productos cárnicos almacenados en empaque normal. Las bacterias ácido lácticas crecieron en el día 21. Los resultados mostraron que el producto cárnico presentó una calidad microbiológica dentro de las normas COVENIN durante 28 días de almacenamiento cuando este fue empaqueado al vacío y 7 días cuando este fue almacenado bajo empaque normal.

Palabras clave: Producto cárnico, carne de pollo deshuesada mecánicamente, sangre de bovino, empaque normal, empaque al vacío, calidad microbiológica.

ABSTRACT

Bovine blood and mechanically deboned poultry meat (CPDM) are food sub-products which, due to their low cost and high nutritional value, are attractive for the formulation of meat products. However, their chemical composition makes them excellent sources for microbial growth. The objective of this research was to study the microbiological quality of a meat product formulated with CPDM, plasma and bovine red cells. The resulting sausage was sliced, and a portion was stored at 5°C with normal packaging and another portion was vacuum packaged. Microbiological analysis was realized on the following days of storage: 0, 7, 14, 21, 28, and 35. Counts of aerobic mesophiles (RAM), total coliforms (CT), *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were made. For vacuum-packed products a lactic acid bacterial counts were made as well. The vacuum-packaged product was within the established norms up until 28 days of storage. For the normal packaging the bacterial counts exceeded limits at 14 days. *E. coli* and *S. aureus* were absent in samples studied, while a growth of CT in stored meat products in normal packaging was observed. Lactic acid bacteria grew at 21 days. These results demonstrate that the meat product maintained acceptable microbiological quality levels within COVENIN norms up to 28 days when vacuum packed and for only 7 days with normal packaging.

Key words: Meat products, mechanically deboned poultry meat, bovine blood, normal packaging, vacuum packaging, microbiological quality.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha incrementado el interés en desarrollar productos cárnicos con alto valor biológico, de fácil distribución y con características organolépticas aceptables.

Las investigaciones apuntan hacia la utilización de subproductos originados en la industria alimentaria tales como la sangre de bovino y la carne de pollo deshuesada mecánicamente (CPDM) [2,15]. La sangre, debido a su alta actividad de agua y pH alrededor de 7,4, se convierte en un excelente medio de cultivo [3]. Por otra parte, el calor de fricción que se genera durante el proceso de obtención de la CPDM favorece el desarrollo de microorganismos que se mezclan con el tejido al separarse de los huesos [14].

El producto final elaborado con estos tipos de materia prima considerados subproductos de la industria alimentaria, podría resultar más económico que aquellos embutidos elaborados con materia prima de primera calidad, sin verse afectada la cantidad ni la calidad proteica, pudiendo ser ofrecido a personas de bajo recursos económicos. Si el producto cárnico es vendido entero; es decir, directamente del empaque donde fue embutido, no habría exposición del mismo a microorganismos, presentando entonces, una buena calidad microbiológica, por lo que se extendería su vida útil; sin embargo, en esta forma de venta su costo sería elevado y su presentación sería poco apreciada por el consumidor, por lo que una alternativa para mejorar estos aspectos, sería el de venderlo en porciones rebanadas; no obstante, una vez que se rompe el empaque original del embutido para proceder a su rebanado, el mismo está expuesto a una gran cantidad de microorganismos [13], lo que unido a la alta contaminación microbiana que podría tener la materia prima empleada en su elaboración [2,19] traería como consecuencia un acortamiento en su vida útil desde el punto de vista microbiológico, haciéndose necesario almacenarlo bajo un empaque adecuado que permita garantizar la salud del consumidor, así como un mayor tiempo de duración del producto para la venta.

El objetivo de este trabajo fue determinar la calidad microbiológica del producto cárnico formulado con sangre de bovino y CPDM, y brindar información acerca de su durabilidad cuando es rebanado y almacenado bajo atmósfera normal y al vacío.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la materia prima

La sangre de bovino fue obtenida de un matadero del estado Zulia, Venezuela y recolectada en envases plásticos limpios que contenían 100 mL de una solución de tripolifosfato de sodio al 2% p/v por cada litro de sangre [20]; posteriormente, fue transportada al laboratorio bajo condiciones de refrigeración (5°C) y separada en sus fracciones plasma y paquete globular mediante centrifugación a 2500 rpm por 25 min en una centrífuga marca International modelo KN^o 69984M23.

La CPDM fue obtenida de diferentes expendios de la ciudad de Maracaibo, estado Zulia, Venezuela.

Preparación y Almacenamiento del Producto Cárnico

El producto cárnico fue elaborado utilizando la metodología y formulación de Benítez y col. [4], modificando el porcentaje de glóbulos rojos de bovino el cual se elevó a un 3,0%.

La CPDM se combinó con las sales y fue mezclada en una licuadora industrial marca ELECTROMASTER, posteriormente fue agregado el resto de los ingredientes y se continuó mezclando por cinco minutos, la mezcla fue embutida en tripas artificiales de 12 cm de diámetro y cocinada a vapor (90°C) hasta alcanzar una temperatura interna de 70°C. El producto cárnico elaborado fue almacenado en refrigeración (5°C) por 24 h, luego fue asépticamente rebanado en porciones de 2 a 3 mm de espesor, utilizando una máquina rebanadora (BOIA H.D.). Parte de estas rebanadas fueron colocadas en varias bandejas de anime y empacadas empleando bolsas plásticas marca Envoplast (Empaque normal) y la otra porción fue empacada usando bolsas plásticas termoencogibles (empaque al vacío) utilizando una máquina empacadora al vacío Multivac. Las porciones se identificaron con la fecha y el tipo de empaque. Las muestras empacadas fueron almacenadas a 5°C durante 35 días de investigación.

Se prepararon un total de 5 embutidos cada mes por un período de 6 meses de investigación.

El proceso de elaboración y rebanado del producto cárnico fue realizado bajo condiciones asépticas y consistió en colocar una solución desinfectante, utilizando para ello guantes esterilizados y mascarillas, dicha solución fue colocada a todos los instrumentos utilizados desde los utensilios empleados en la elaboración del embutido hasta la rebanadora utilizada.

Preparación de las diluciones de las muestras.

Se pesaron 11 g de la muestra a analizar, se colocaron en un frasco homogeneizador estéril conteniendo 99 mL de agua peptonada alcalina estéril al 0,1%, mezclándose en una licuadora a medianas revoluciones por 2 min, a partir de esta dilución (10^{-1}) se prepararon 5 diluciones seriadas (10^{-2} a 10^{-6}) en tubos con 9 mL de agua peptonada alcalina estéril. Cada procedimiento fue realizado por triplicado.

Recuento de aerobios mesófilos, coliformes totales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

Las muestras se examinaron usando placas PETRIFILM 3M (placas de películas secas rehidratables) específicas para cada uno de los microorganismos, en las cuales se vertió 1 mL de cada una de las diluciones de las muestras [5], luego se distribuyó el inóculo usando una lámina plástica difusora y se incubaron durante 24-48 h a 35°C en posición horizontal. Después de 24 h, las placas de *S. aureus* fueron incubadas a 63°C por 1 h, posteriormente se les colocó el disco reactivo de TNasa y fueron incubadas nuevamente a 35°C observándose cada 60 min por un tiempo máximo de 3 h. Finalmente se procedió al conteo de las colonias tomando en cuenta las placas que presentaban de 15 a 150 colonias, de acuerdo a las ca-

racterísticas siguientes: los aerobios mesófilos se observan de color rosado; *S. aureus* de color azul con un halo rosado, las colonias típicas de *E. coli* se presentan de color azul o morado asociadas a burbujas de gas y las de coliformes de color rojo igualmente asociadas a una o más burbujas de gas [6].

Recuento de bacterias ácido lácticas

El conteo de las bacterias ácido lácticas se realizó por el método de superficie utilizando agar MRS (De Man, Rogosa y Sharpe) en el cual se colocó 0,1 mL de cada dilución de la muestra, luego se incubó por 48 h a 35°C en jarra de Gas Pack bajo condiciones microaerófilas (5-10% de CO₂); transcurrido este tiempo se contaron las colonias como bacterias ácido lácticas [16].

Análisis estadístico.

Los datos fueron estudiados utilizando un análisis de varianza mediante el procedimiento del Modelo Lineal General (PROC GLM) del paquete estadístico SAS [22]. Las medias se compararon mediante pruebas de DUNCAN [9]. Las diferencias fueron dadas a un nivel de 95% de significancia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la TABLA I se presentan los valores promedio del recuento de aerobios mesófilos del producto cárnico. Los resultados muestran que el producto almacenado con empaque normal mostró en el día 7 del estudio un crecimiento de aerobios mesófilos con un valor de 3,96 log UFC/g, estando dentro de los límites establecidos por las Normas COVENIN [7]; sin embargo, para el día 14 el crecimiento fue de 5,57 log UFC/g, valor que excede esta normativa. Por su parte, el producto almacenado con empaque al vacío reflejó un crecimiento escaso (1,18 log UFC/g) permaneciendo estable y dentro de la norma-

tiva hasta 28 días de investigación, para el día 35 el crecimiento observado (5,29 log UFC/g.) excede la normativa.

Se ha reportado que la CPDM puede aportar hasta 6,19 log UFC de aerobios mesófilos por gramo de muestra [2] y la sangre hasta 4,9 log UFC/g [19]. Esta carga bacteriana de la materia prima pudo influir en el crecimiento de aerobios mesófilos del producto final; sin embargo, el tratamiento térmico recibido por el producto (70°C de temperatura interna de cocción) asegura una disminución de la carga microbiana inicial de la materia prima [4]. No obstante; la manipulación de los productos después de cocidos, tales como el rebanado previo al empaque, representa uno de los principales factores que tienden a incidir en los niveles de contaminación por los aerobios mesófilos en los productos cárnicos cocidos [12]. Se ha demostrado que en la práctica comercial la técnica del rebanado puede adicionar hasta 2,0 log UFC de bacteria /g [17]. Sin embargo, Holley y col. [11] demostraron que si se aplican adecuadas prácticas de higiene, la inoculación de microorganismos durante el rebanado podría ser tan bajo como 0,5 log UFC/g, pudiéndose extender de esta forma su vida útil. Anderson y col. [1] observaron una disminución de la vida útil de productos cárnicos precocidos, rebanados, empacados al vacío y refrigerados a 5°C, por el crecimiento de aerobios mesófilos con contajes de hasta 6,7 log UFC/g, durante los primeros 14 días de almacenamiento, señalando que la contaminación post tratamiento pudo ser originada por el rebanado o por fallas en el proceso de empaque.

La TABLA II muestra los valores promedio de coliformes totales. El producto cárnico con empaque normal se encontró dentro de los límites establecidos por las normas COVENIN [7] solo durante los primeros 7 días de almacenamiento. En el empacado al vacío no se observó crecimiento de estas bacterias durante el período de estudio, resultados que se diferencian del crecimiento de coliformes totales citados por Anderson y col. [1] en productos cárnicos precocidos, rebana-

TABLA I
VALORES PROMEDIO* DEL RECUENTO DE AEROBIOS MESÓFILOS EN EL PRODUCTO CÁRNICO CON EMPAQUE NORMAL Y AL VACÍO

Días de almacenamiento	Tipo de Empaque		Norma COVENIN
	Normal	Vacío	
0**	<1 ^a	<1 ^a	
7	3,96 ± 0,30 ^b	<1 ^a	4-5
14	5,57 ± 0,27 ^c	1,18 ± 0,22 ^b	
21	8,36 ± 0,23 ^d	2,16 ± 0,36 ^c	
28***	-	3,36 ± 0,28 ^d	
35***	-	5,29 ± 0,31 ^e	

* Expresados en Log UFC/g. **0 significa 24 horas en refrigeración después de cocido. *** Para estas fechas no se realizó el conteo microbiológico debido al deterioro en sus características organolépticas. a,b,c,d,e: Medias con diferentes superíndices y en una misma columna difieren significativamente (P<0,05). n=30.

dos, empacados al vacío y almacenados a temperatura de 5°C durante 28 días, quienes reportan que el crecimiento de coliformes totales en el producto se debió a una contaminación post-tratamiento, señalando que el tiempo y la temperatura de procesamiento, así como estrictas medidas de higiene durante el rebanado, deben ser debidamente monitoreados para este tipo de producto. Ciertos investigadores reportan que el crecimiento de enterobacterias en carnes almacenadas con empaque al vacío puede ser ocasionada por una tasa elevada de transmisión de oxígeno en la película del empaque [23], por lo que el proceso de empacado, también debe ser estrictamente controlado.

La TABLA III indica los valores de recuento de *E. coli* y *S. aureus* en el producto cárnico estudiado. Se observa que los contajes de estos microorganismos fueron menores de 1 log UFC/g, resultados que indican la ausencia de estas bacterias patógenas en las muestras analizadas, a pesar que se ha reportado que la CPDM presenta un recuento de 2,97 a 3,35 log UFC de *E. coli* por gramo de muestra y hasta 1,39 log UFC de *S. aureus* por gramo de muestra [2]; sin embargo, la pre-

sencia de estos microorganismos en la materia prima, posiblemente pudo ser inactivada por el proceso térmico recibido por el producto [4].

Los valores promedio de bacterias ácido lácticas en el producto cárnico empacado al vacío se presentan en la TABLA IV. Durante los primeros 14 días de almacenamiento no hubo crecimiento de estos microorganismos, solamente a partir del día 21 se evidenció un crecimiento de 2,56 log UFC/g, siendo un valor no significativo de deterioro. Las bacterias ácido lácticas son los microorganismos que predominan en carnes y productos cárnicos almacenados al vacío, inicialmente estas bacterias presentan función protectora, ya que su crecimiento otorga al medio condiciones especiales que permite la exclusión de especies patógenas [8]. Sin embargo Newton y col. [18], han señalado presencia de *pseudomonas* en aquellas carnes y productos cárnicos que presentan defectos en el empaque al vacío, descomponiendo la carne cuando la densidad celular alcanza 6 log UFC/g, tendiendo a disminuir la vida útil de la carne por la presencia de limo y de olores y sabores desagradables, pero si la flora normal es dominada por *Lacto-*

TABLA II
VALORES PROMEDIO* DE COLIFORMES TOTALES EN EL PRODUCTO CÁRNICO CON EMPAQUE NORMAL Y AL VACÍO

Días de almacenamiento	Tipo de Empaque		
	Normal	Vacío	Norma COVENIN
0**	<1 ^a	<1	<1
7	<1 ^a	<1	
14	2,39 ± 0,29 ^b	<1	
21	3,17 ± 0,09 ^c	<1	
28	4,27 ± 0,17 ^d	<1	
35	5,25 ± 0,11 ^e	<1	

* Expresados en Log UFC/g. ** 0 significa 24 horas en refrigeración después de cocido. a,b,c,d,e: Medias con diferentes superíndices y en una misma columna difieren significativamente (P<0,05). n=30.

TABLA III
VALORES PROMEDIO* DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus* EN EL PRODUCTO CÁRNICO CON EMPAQUE NORMAL Y AL VACÍO

Días de almacenamiento	Tipo de Empaque				Norma COVENIN
	Norma		Vacío		
	<i>E. coli.</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli.</i>	<i>S. aureus</i>	
0**	<1	<1	<1	<1	<1
7	<1	<1	<1	<1	
14	<1	<1	<1	<1	
28	<1	<1	<1	<1	
35	<1	<1	<1	<1	

* Expresados en Log UFC/g. ** 0 significa 24 h en refrigeración después de cocido. <1 Significa que no hubo desarrollo de colonias. n=30.

TABLA IV
VALORES PROMEDIO* DE BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS
EN EL PRODUCTO CÁRNICO EMPACADO AL VACÍO

Días de almacenamiento	Vacío
0**	<1 ^a
7	<1 ^a
14	<1 ^a
21	2,56 ± 0,36 ^b
28	3,28 ± 0,17 ^c
35	4,15 ± 0,19 ^d

* Expresados en Log UFC/g. ** Significa 24 horas en refrigeración después de cocido. a,b,c,d Medias con diferentes superíndices difieren significativamente (P<0,05). n=30.

bacilos la descomposición se debe entonces a la acumulación de ácidos grasos de cadena corta [24].

El crecimiento retardado de las bacterias ácido lácticas en esta investigación se debió probablemente al tratamiento térmico recibido por el producto cárnico durante la cocción (temperatura interna de 70°C). Según lo reportado por otros investigadores [17], las bacterias ácido lácticas crecen difícilmente en productos cárnicos cocidos y empacados al vacío; sin embargo, su aislamiento en estos productos puede deberse posiblemente a una contaminación posterior al tratamiento, tales como el rebanado, enfriamiento y empacado [10]. Resultados similares fueron obtenidos por Samelis y col. [21] quienes refieren que las bacterias ácido lácticas fueron fuertemente afectadas por el tratamiento térmico y el menor crecimiento fue observado en carnes empacadas al vacío, cocidas a temperaturas de 72 a 74°C.

CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación indican que el producto cárnico estudiado puede almacenarse u ofrecerse para la venta, rebanado, empacado al vacío y almacenado a 5°C durante 28 días, sin riesgos microbiológicos según las normas COVENIN y si éste es almacenado bajo empaque normal, su permanencia en estantes no puede ser mayor a 7 días a esta misma temperatura.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de La Universidad del Zulia (CONDES) por el financiamiento de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANDERSON, M.; KEETON, J.; ACUFF, G.; LUCIA, L.; VANDERZANT, C. Microbiological characteristics of pre-cooked, vacuum packaged uncured beef and pork. **Meat Sci.** 25:69-79. 1989.
- [2] ARCHILE, A.; MÁRQUEZ, E.; BENÍTEZ, B.; RANGEL, L.; BRACHO, M.; IZQUIERDO, P. Calidad nutricional de la carne de pollo deshuesada mecánicamente. **Anal. Vzln. Nutr.** 13(2):88-93. 2000.
- [3] BARBOZA, Y.; MÁRQUEZ, E. Utilización de plasma sanguíneo de bovino como fuente proteica en la formulación de un medio de cultivo para *Lactobacillus*. **Revista Científica, FCV-LUZ.** IV(1):55-59. 1994.
- [4] BENÍTEZ, B.; MÁRQUEZ, E.; BARBOZA, Y.; IZQUIERDO, P.; ARIAS, B. Formulación y características de productos cárnicos elaborados con subproductos de la industria animal. **Revista Científica, FCV-LUZ.** X(4):321-327. 2000.
- [5] CHAMPAGN, C.; GARDNER, N.; PIETTE, M.; GELAIS, R. The use of petrifilm for enumeration of Lactococci. **Elsevier.** 789-795 pp. 1994.
- [6] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). **Alimentos. Recuentos de Coliformes y de *Escherichia coli*. Método en placas con películas secas rehidratables (petrifilm).** Categoría 3276. 1-4 pp. 1997.
- [7] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). **Norma Venezolana de salchichas de aves.** 1-4 pp. 1993.
- [8] COOKSEY, D.; KLEIN, B.; MACKETH, F.; BLASCHEK, H. Reduction of *Lysteria monocytogenes* in precooked vacuum-packaged beef using postpackaging pasteurization. **J. Food Prot.** 55:4-7.1993.
- [9] DUNCAN, D. Multiple range and multiple F Test. **Biometrics.** 11:1-42.1970.
- [10] DYKES, G.; CLOETE, T.; VON HOLY, A. Quantification of microbial populations associated with the manufacture of vacuum-packaged, smoked Vienna sausages. **Int. J. Food Microbiol.**13: 239-248. 1991.
- [11] HOLLEY, R.; DOYON, G.; FORTIN, J.; RODRIGUEZ, N.; CARBONNEAU, M. Post-process, packaging-induced fermentation of delicatessen meats. **Food Res. Int.** 29:35-48.1996.
- [12] HOLLEY, R.; MCKELLAR, R. Influence of unsliced delicatessen meat freshness upon bacterial growth in subsequently prepared vacuum packed slices. **Int. J. Food Microbiol.** 29:297-309. 1996.

- [13] HOLLEY, R. Asymetric distribution and growth of bacteria in sliced vacuum-packaged ham an bologna. **J. Food Prot.** 60(5):510-519. 1997.
- [14] KUMAR, S.; WISMER-PEDERSEN, J.; CASPERSEN, C. Effect of raw material deboning methods and chemical additives on microbial quality of mechanically deboned poultry meat during frozen storage. **J. Food Sci. Technol.** 23:217-220. 1986.
- [15] MÁRQUEZ, E.; BENÍTEZ, B.; MÉNDEZ, N.; RANGEL, L.; MEDRANO, I.; IZQUIERDO, P.; ROMERO, R.; CASTEJÓN, H. Características nutricionales de una galleta formulada con plasma sanguíneo de bovino como principal fuente proteica. **Arch. Latin. Nutr.** 48(3):250-255. 1998.
- [16] MERCK. Manual de medios de cultivo. Editorial Merck. Alemania. 140 p. 1994.
- [17] MOL, J.; HIETBRINK, H.; MOLLEN, W.; VAN TINTEREN, J. Observations on the microflora of vacuum packed sliced cooked meat products. **J. Appl. Bacteriol.** 34:377-397. 1971.
- [18] NEWTON, K.; HARRISON, J.; K, SMITH. The effect of storage in various gaseous atmospheres on the microflora of lamb chops held at 1°C. **J. Appl. Bacteriol.** 43:53-59. 1977.
- [19] PÉREZ, G.; BARBOZA, Y.; MÁRQUEZ, E. Efecto de la temperatura en la calidad bacteriológica del plasma sanguíneo de bovino. **Revista Científica, FCV-LUZ.** VII(2):139-144. 1997.
- [20] RANGEL, L.; ARCHILE, A.; CASTEJÓN, O.; IZQUIERDO, P.; MÁRQUEZ, E. Utilización del tripolifosfato como anticoagulante y su efecto sobre las propiedades emulsificantes del plasma. **Revista Científica, FCV-LUZ.** V(2):111-116. 1995.
- [21] SAMELIS, J.; KAKOURI, A.; REMENTZIS, J. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. **Food Microbiol.** 17:329-340. 2000.
- [22] Statistic Analysis System Institute (SAS). "SAS User's Guide: Statistics". University North of California, USA., Versión 6,04. 1991.
- [23] SIMARD, R.; LEE, B.; LALEYE, C.; HOLLEY, A. Effects of temperature, light and storage time on the microflora of vacuum or nitrogen packed frankfurter. **J. Food Prot.** 46:199-206. 1983.
- [24] SUTHERLAND, J.; GIBBS, P.; PATTERSON, J.; MURRAY, J. Biochemical changes in vacuum-packaged beef occurring during storage at 0-2°C. **J. Food Technol.** 11:171-180. 1976.