

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA



ESCUELA DE INGENIERÍAS AGRARIAS



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTO
DE BAGAZO DE CERVEZA EN UN PRODUCTO CÁRNICO
ENVASADO EN MAP Y REFRIGERADO**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**MÁSTER U. GESTIÓN CALIDAD Y TRAZABILIDAD ALIMENTOS DE
ORIGEN VEGETAL**

Ana María López Valenzuela

Badajoz, junio 2021

TRABAJO FIN DE MÁSTER
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTO
DE BAGAZO DE CERVEZA EN UN PRODUCTO CÁRNICO
ENVASADO EN MAP Y REFRIGERADO.

MÁSTER U. GESTIÓN CALIDAD Y TRAZABILIDAD ALIMENTOS DE
ORIGEN VEGETAL

AUTOR: Ana María López Valenzuela

TUTOR/ES: Ana Isabel Andrés Nieto, María Jesús Pretón Testón

Tutor



Fdo: Ana Isabel Andrés Nieto

Cotutor



Fdo: María Jesús Pretón Testón

Convocatoria: julio, 2021

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN.....	6
2.1. Historia de la cerveza	7
2.2. El sector cervecero.....	8
2.3. El sector de la cerveza durante la crisis de la COVID-19	10
2.4. Calidad de la carne	11
2.4.1. Color	11
2.4.2. Estabilidad oxidativa	13
2.4.3. Calidad higiénico-sanitaria de la carne y productos cárnicos frescos picados	14
2.5. Estrategias para prolongar la vida útil de los productos cárnicos	15
2.5.1. Refrigeración	16
2.5.2. Envasado en atmósferas modificadas	16
2.5.3. Aditivos	17
3. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	21
4. MATERIAL Y MÉTODOS	24
4.1. Reactivos	25
4.2. Obtención de las muestras de carne.....	25
4.3. Obtención de los extractos de subproductos	25
4.4. Preparación y envasado de las muestras.....	26
4.5. Análisis de las características físico-químicas de las muestras	27
4.5.1. Análisis de las mermas durante el almacenamiento	28
4.5.2. Determinación de la humedad	28
4.5.3. Análisis de la evolución de la composición de gases en el espacio de cabeza	28
4.5.4. Determinación de pH.....	28
4.5.5. Evaluación instrumental del color	28
4.5.6. Determinación del grado de oxidación lipídica.....	29
4.5.7. Determinación del grado de oxidación proteica	29
4.5.8. Análisis microbiológico.....	30
4.5.9. Análisis estadístico	30
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32

5.1. Evolución del contenido de O ₂ y CO ₂ de gases en el espacio de cabeza y merma de peso, contenido de humedad y pH.....	33
5.2. Medición instrumental del color.....	37
5.3. Estabilidad oxidativa de lípidos y proteínas.....	40
5.4. Análisis microbiológico.....	44
6. CONCLUSIONES.....	47
7. BIBLIOGRAFÍA.....	49
8. WEBGRAFÍA.....	61

1. RESUMEN

1. RESUMEN

Para llevar a cabo el presente trabajo, se obtuvieron extractos a partir de un subproducto de elaboración de la cerveza, el bagazo (BSG), procedente de una cervecería artesana local. A este subproducto se le realizó una extracción de compuestos fenólicos en medio acuoso con Ultrasonidos, tras la cual, el extracto resultante se liofilizó y se añadió en diferentes concentraciones (1000 y 3000 mg/kg) a hamburguesas de carne de cerdo, que fueron envasadas en atmósfera modificada y almacenadas en refrigeración ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$) durante 9 días.

Se realizaron análisis físico-químicos y microbiológicos relacionados con la calidad de la carne a estas hamburguesas y se compararon con muestras sin ningún tipo de aditivo (CONTROL-) y con ascorbato sódico (1000 mg/kg carne, CONTROL+). El color de las hamburguesas resultó afectado por los distintos tratamientos, siendo el lote CONTROL+ el que presentó valores de luminosidad (L^*) y a^* más elevados tras 4 y 9 días de almacenamiento ($P < 0,01$). El lote CONTROL- fue el que menores valores de a^* presentó ($P < 0,05$) durante todo el periodo de almacenamiento. Los lotes BSG 1000 y BSG 3000 mostraron valores más bajos del parámetro a^* que el lote CONTROL+, pero más elevados que el lote CONTROL- (sin aditivo), por lo que se pudo evidenciar su capacidad conservante del color. En cuanto a la oxidación lipídica, los valores de TBA aumentaron significativamente ($P < 0,05$) durante todo el periodo de almacenamiento, siendo el lote CONTROL+ el que presentó reacciones de oxidación menos intensas tras 4 ($P < 0,01$) y 9 ($P < 0,001$) días de refrigeración en comparación con el resto de tratamientos. La adición de 1000 y 3000 mg/kg a las hamburguesas fue eficaz para reducir la oxidación lipídica frente al lote CONTROL- en el día 4 de almacenamiento pero fue menos efectiva para reducir la oxidación lipídica que la adición de ascorbato sódico después de 9 días ($P < 0,01$). Los valores de oxidación proteica no se vieron afectados ni por el tiempo de almacenamiento durante los 9 días de refrigeración ni por la adición de extractos. Los recuentos de bacterias ácido lácticas, Enterobacterias totales y microorganismos psicrófilos, presentaron un aumento significativo tras 4 y 9 días ($P < 0,05$). Respecto a la adición de extractos, en el día 4, el lote BSG 1000 fue el que menores recuentos de Enterobacterias totales y psicrófilos tuvo ($P < 0,001$), mientras que en el día 9, fue el lote CONTROL- el que tuvo menores recuentos de éstos ($P < 0,001$ y $P < 0,05$). En cuanto a los recuentos de bacterias ácido lácticas, los lotes con extracto de

bagazo liofilizado presentaron menores recuentos que el CONTROL– después de 4 días de almacenamiento en refrigeración. Por tanto, el empleo de extractos de bagazo liofilizado podría ser de interés como aditivo en productos cárnicos debido, sobre todo, al aumento de la estabilidad lipídica y el efecto conservante del color rojo, como se demuestra en el presente estudio en hamburguesas de carne de cerdo almacenadas durante 9 días bajo condiciones de refrigeración y atmósferas protectoras.

2. INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Historia de la cerveza

La producción de cerveza se remonta a miles de años. La primera receta escrita para su elaboración se encontró en hallazgos arqueológicos de la antigua Sumeria. En el antiguo Egipto, la cerveza formaba parte de la dieta básica de la población, adquiriendo una sólida dimensión industrial en la época de los faraones, (Cervecistas, 2020). En la antigua Grecia, al tener más terrenos dedicados al cultivo de viñedos, la cerveza se sustituyó por el vino, costumbre que fue tomada por el Imperio Romano, quedando la cerveza desplazada al norte de Europa, donde existía una gran influencia de las tribus germánicas, especialmente en Gran Bretaña, Bélgica y Alemania. Hasta el siglo V, cuando las tribus germánicas comienzan a invadir el Imperio Romano, no será cuando la cerveza vuelva a adquirir protagonismo en Europa (Barber, 2014).

En la Edad Media, con Carlomagno, la cerveza adquirió un gran apogeo y se comenzó a comercializar en grandes cantidades, aunque fue en los monasterios donde se concentró la mayor producción. En el siglo XVI se comprobó que el lúpulo prolongaba eficientemente la vida útil de la cerveza, aunque no fue hasta el siglo XVII cuando Inglaterra lo emplea en sus elaboraciones. La producción de cerveza pasó de ser un monopolio del clero a ser elaborada por el pueblo en el año 1516 en Baviera. El duque Guillermo IV, que tenía concesión sobre la cebada, reguló la producción de cerveza con la “Ley de Pureza de 1516” el 23 de abril de 1516, donde se establecía que los ingredientes básicos y únicos que debía contener la cerveza son: agua, malta, lúpulo y levadura (Cervecistas, 2020).

En el siglo XVI hubo importantes avances tecnológicos en la industria cervecera. Los monasterios de Baviera, por prohibición del Duque Alberto V de Baviera, tuvieron que dejar de elaborar durante los meses estivales, por lo que solo la podían almacenar. Estas circunstancias provocaron la producción de la cerveza tipo Lager, con un sabor más acentuado y una apariencia más clara (Cervecing, 2017)

En 1842, un maestro cervecero alemán, de Pilsen, comenzó a controlar la temperatura en el malteado de la cebada para poder conseguir un color dorado. La selección de las levaduras ayudó a la fermentación, consiguiendo una mayor transparencia. Con este estilo, Pilsen, se consagró uno de los estilos más consumidos en

el mundo. Durante la revolución industrial, en Inglaterra, se comenzó a vender cerveza en los pubs. La cerveza se fue convirtiendo en una bebida popular, que con ayuda de la microbiología, con el descubrimiento de la naturaleza de las levaduras, los medios de transportes u otras innovaciones como la refrigeración o el envasado, permitió que se pudiera elaborar durante todo el año (Cervecistas, 2020).

Actualmente, a la hora de beber una cerveza, se tiene en alta estima la diversidad y la calidad, con ello surgen nuevas tendencias para recuperar aquellas cervezas más tradicionales perdidas por el paso del tiempo como las cervezas de trigo Belgas, las amargas o las Indian Pale Ale (IPA) (Cervecing, 2017).

2.2. El sector cervecero

El consumo de cerveza en los hogares españoles al finalizar el año 2020 ha incrementado un 29% con respecto al año anterior, recuperando, de esa forma el descenso puntual que había sufrido el consumo de cerveza desde el año 2008. En el año 2020 hubo un crecimiento con relación al consumo per cápita, cerrando en 23,31 litros por personas, supone una variación del 28,7%, el equivalente a consumir 5,20 litros por persona y periodo de estudio (MAPA, 2021).

TABLA 2. 1. Resultados totales del consumo de cerveza en España en 2020 y la variación con respecto al año 2019. (Fuente: Informe del consumo de alimentación en España 2019, MAPA)

	Consumo doméstico de Cerveza en 2019	% Variación 2019 vs 2018
Volumen (miles L)	1.077.466,35	29%
Valor (miles €)	1.485.407,75	34.3%
Consumo x cápita (L)	23,31	28,7%
Gasto x cápita (€)	23,13	34%
Parte de mercado volumen (%)	3,38	0,47%
Parte de mercado valor (%)	1,87	0,28%
Precio medio (€/L)	1,38	4,1%

La compra de cerveza representó el 1,87% del presupuesto que los hogares españoles destinaron a la compra de alimentación y bebidas para el hogar en 2020, lo

que supone un incremento del 0,28% respecto al año anterior. Esto equivale a un gasto medio por persona y año de 23,13€, que se traduce en un aumento del 34% respecto al mismo período del año anterior (MAPA, 2021). Estos valores son presentados en la TABLA 2.1, junto con otros valores de consumo de cerveza en España.

Las Comunidades Autónomas como Islas Baleares, La región de Murcia Andalucía y la Comunidad de Madrid son las que mayor volumen de cerveza han consumido en el año 2020 (MAPA, 2020).

En 2018 España fue la cuarta productora de cerveza a nivel Europeo por detrás de Alemania, Polonia y Reino Unido, con una producción de casi 40.000 HL (Brewers of Europe, 2019).

Los mayores productores de cerveza en España son Mahou-San Miguel, Heineken España y Grupo Damm con una producción del 91%. Le siguen Hijos de Riviera, Compañía Cervecera de Canarias S.A. y Grupo Ágora (De Urbina Criado et al., 2015).

Dentro del sector de la cerveza se encuentra un mercado alternativo en pleno auge: la cerveza artesanal o *craft beer*. Ésta prioriza el empleo de materias primas de buena calidad, realizando la gran parte del proceso de elaboración de forma manual. Las etapas claves del proceso en la que se puede diferenciar a una cerveza artesana de una industrial es la pasterización, que en la cerveza artesana no se lleva a cabo (Albán et al., 2015), no se les puede añadir nada de índole artificial como aditivos o coadyuvantes tecnológicos y no se filtran, por lo que la bebida resultante presenta cierta turbidez (Martínez, 2015)

Aunque el movimiento de la cerveza artesanal tuvo lugar en EE. UU., existe un mayor número de fábricas en Europa que en EE. UU. Los 10 países que más producen cerveza artesana son EE. UU., Reino Unido, Alemania, Italia, España, Francia, Canadá, Holanda, Suiza y Australia (Agrodigital, 2017).

La fabricación de cerveza artesanal consiste en la “elaboración conforme a lo establecido en la presente norma de calidad, mediante un proceso que se desarrolle de forma completa en la misma instalación y en el que la intervención personal constituye el factor predominante, bajo la dirección de un maestro cervecero o artesano con

experiencia demostrable y primando en su fabricación el factor humano sobre el mecánico, obteniéndose un resultado final individualizado, que no se produzca en grandes series, siempre y cuando se cumpla la legislación que le sea aplicable en materia de artesanía” (B.O.E., 2016).

En los últimos años se ha podido observar un incremento acelerado de las microcervecías en Extremadura. El boom de la cerveza artesana está dejando de ser una simple moda y pasa a ser una tendencia asentada. La cerveza artesana es un producto de alta gama en el que se emplean materias primas de alta calidad, en el proceso se permite una fermentación natural, sin filtrado y sin carbonatación artificial (Extremadura21, 2016).

En la provincia de Badajoz nos podemos encontrar con las marcas Piporra (Aceuchal), Ballut (Badajoz), Soto (Barcarrota), La Bicha (Cabeza del Buey), La Siberia (Herrera del Duque), La Loba (Mérida) Arcadia (Villafranca de los Barros), Sevebrau (Villanueva de la Serena) y Jara (Villanueva del Fresno); mientras que en Cáceres se dispone de Mangurria (Cáceres), Ambroz (Hervás), Blomberg (Plasencia), Monteña (Plasencia), Belona (Trujillo) y Cerex (Zarza de Granadilla) (Extremadura21, 2016).

Uno de los grandes problemas que tienen las cervecías artesanales es la limitación de su sostenibilidad económica en cuanto a equipos e instalaciones como los costes de impuestos y consumo de energía (Albanese et al., 2018).

El subproducto más importante que se genera en este tipo de industrias es el bagazo, malta agotada en la maceración, resultante del filtrado del mosto de cerveza, representando el 85% del total de subproductos. Se generan unos 20 kg por cada 100 L de cerveza (Nigan, 2017).

2.3. El sector de la cerveza durante la crisis de la COVID-19

Normalmente una de cada tres cervezas se consume en un pub, restaurante o cafetería. Para los cerveceros es la ruta más valiosa de mercado y en el caso de cervecías más pequeñas es su única forma de llegar al consumidor. Como consecuencia de la COVID-19 y del confinamiento al que la mayoría de países se vieron forzados durante unos tres meses, las cervezas se dejaron estropear en bares y fábricas,

llegando incluso a tener que ser destruidas. Con los eventos, festivales y reuniones sociales privadas prohibidos, en la mayoría de los países se redujo de manera significativa el consumo de cerveza (Reconnect Beer, 2020).

El sector de la cerveza se ha visto realmente afectado con la crisis de la Covid-19, según indica Jacobo Olalla en su entrevista para CELCE MAGAZINE, las ventas globales han experimentado un descenso desde el comienzo de la pandemia. A causa de los diversos cierres que ha tenido la hostelería, el 2020 ha finalizado con un acumulado de caída de consumo en la hostelería de más del 40%, (Varela, 2021). Debido a ello muchas cervecerías han tenido que modificar sus modelos de negocios o desarrollar todo tipo de iniciativas alejadas de la producción de cerveza para dar un servicio a la sociedad, y sobre todo, al sector sanitario, ofreciendo sus instalaciones y equipos para producir máscaras de protecciones facial, fabricación de soluciones hidroalcohólicas y alcohol de 96°. Otra de las iniciativas fue sumarse a la campaña “Food4Heroes”, en la que se dotaba de comida y bebida al personal sanitario (Merita, 2020). Para promocionar el consumo de cerveza, hubo cervecerías, como la Compañía Cervecera de Canarias, que vendieron tickets a sus clientes por cerveza que se podrían disfrutar una vez se permitiese la reapertura de los bares, de esta forma podían tener la liquidez que en ese momento les era crucial. O como el grupo Mahou-San Miguel, que repuso los barriles que quedaron abiertos cuando se decretó el Estado de Alarma (Merita, 2020). También se llevaron a cabo la venta online de los pequeños productores de cerveza, debido a que las grandes superficies retiraron de sus lineales estos productos por su mayor precio, según explica Mateo Sanz en La Vanguardia (La Vanguardia, 2020).

2.4. Calidad de la carne

La calidad de la carne se define en función de su composición y de factores de palatabilidad como aspecto, olor, firmeza, jugosidad, ternura y sabor.

2.4.1. Color

El color es el atributo más importante en la evaluación de los productos alimentarios debido a que se puede emplear para determinar parámetros como la seguridad, maduración o frescura (Salueña et al, 2019).

Es un parámetro clave para la decisión de compra de los consumidores, ya que uno de cada dos consumidores rechaza el producto cuando el color no es rojo brillante.

En la carne, el pigmento responsable del color es la mioglobina, pudiéndose encontrar como deoximioglobina, oximioglobina y metamioglobina en función del estado químico en el que se encuentre, reducido, oxigenado u oxidado respectivamente (Salueña et al, 2019). En la FIGURA 2.1 se puede observar los diferentes estados de la mioglobina.

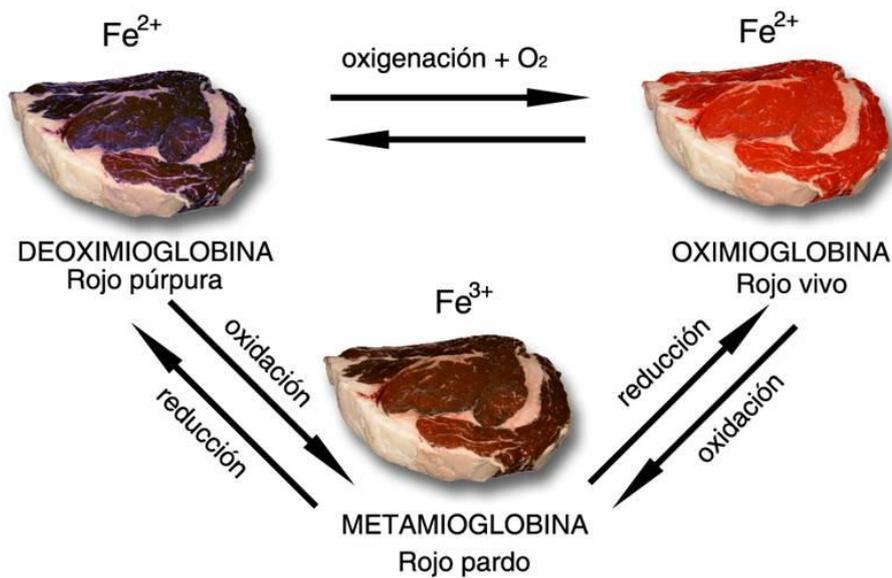


FIGURA 2. 1 Transformaciones de la mioglobina en la carne. (Fuente: Lawrie, 1998)

La mioglobina, en ausencia de oxígeno se encuentra en su estado reducido. En cuanto la superficie de la carne entra en contacto con el aire, la deoximioglobina se transforma en oximioglobina, adquiriendo la carne un color rojo brillante. Cuando la mioglobina se oxida progresivamente favorece el pardeamiento y, por tanto, pierde su atractivo aspecto. Cuando la carne se expone al aire se produce la oxigenación de la mioglobina, formando el compuesto oximioglobina que imparte un color rojo brillante. Bajo la capa roja brillante de tejido oxigenado se sitúa una fina marrón, en principio, apenas apreciable (metamioglobina) y en la profundidad, la capa púrpura (deoximioglobina). La formación de metamioglobina es el mayor problema para preservar un color estable en la carne (Salueña et al, 2019). En contacto con el aire

existe una tendencia de la carne a oxidarse, pero la reacción es paulatina en condiciones adecuadas de conservación.

Los cortes frescos retienen el color rojo brillante atractivo aproximadamente durante unas 72 horas o más si las condiciones de comercialización son buenas (temperatura, iluminación, gases...). Por el contrario, la decoloración marrón responsable de la pérdida de calidad se puede acelerar tanto por la actividad enzimática muscular como por el crecimiento microbiano (Mateo, 2007).

2.4.2. Estabilidad oxidativa

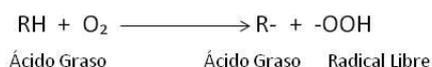
La oxidación de la carne puede ocurrir en cualquier momento entre el sacrificio del animal y la utilización de la carne por el consumidor. En el momento de sacrificio, se inactivan los mecanismos biológicos de protección frente a la oxidación *in vivo*, se produce el cese del flujo sanguíneo, acumulación de ácido láctico en los tejidos, descenso de pH y cese de los mecanismos celulares capaces de controlar los procesos oxidativos (Campion, 2013). Incluso se puede dar la posibilidad de que un estado de estrés conduzca a una alteración del estado fisiológico del animal, posibilitando una alteración oxidativa de la carne obtenida después del sacrificio del animal (Coma et al., 1999).

El mecanismo general de oxidación de los lípidos consta de tres fases, como puede observarse en la FIGURA 2.2: la fase de iniciación, donde se forman los radicales libres, la fase de propagación, con las reacciones en cadena de los radicales libres; y la fase de terminación con la formación de productos no radicales libres (Santos-Fandila et al., 2014).

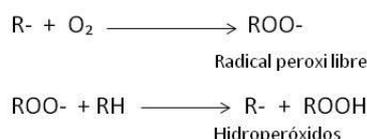
El proceso oxidativo en la carne se inicia con la aparición de radicales libres. Estos radicales se forman en los procesos de reducción del oxígeno molecular a agua en el tejido muscular, derivando en anión superóxido (O^{2-}), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^\cdot). El radical hidroxilo es altamente reactivo, teniendo una gran afinidad por los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados de las membranas lipídicas (Campion, 2013). De hecho, los lípidos que tienen una mayor tendencia a sufrir oxidación son los ácidos grasos insaturados, oleico, linoleico y linolénico (Santos-Fandilla et al., 2014).

En la etapa inicial también se produce la formación de radicales aquilo a partir de lípidos insaturados que pierden un hidrógeno lábil adyacente al doble enlace por la influencia de factores como el calor, la luz o iones metálicos. Es un proceso lento hasta que la concentración de radicales alcanza un valor crítico, donde comienza un mecanismo de propagación acelerado. Esto conlleva una rápida producción de los compuestos primarios de la oxidación: los hidroperóxidos, los cuales se forman por la reacción de los radicales libres con el oxígeno molecular. Los hidroperóxidos, al ser muy lábiles se descomponen produciendo los radicales $ROO\cdot$ y $RO\cdot$. Éstos dan lugar a productos secundarios de la oxidación, compuestos volátiles y no volátiles de bajo peso molecular como los hidrocarburos, aldehídos, cetonas, alcoholes, ácidos, etc., varios de los cuales causan el aroma y sabor típicos de la rancidez (Venegas y Pérez, 2018).

1. Iniciación



2. Propagación



3. Finalización

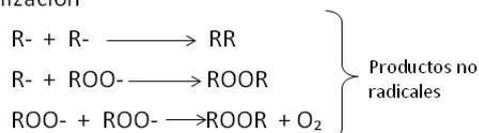


FIGURA 2. 2 Mecanismo de auto-oxidación de lípidos (Fuente: Barbero López, M., 2017)

2.4.3. Calidad higiénico-sanitaria de la carne y productos cárnicos frescos picados

Siguiendo lo establecido en el Capítulo II de la Sección V del Reglamento (CE) N° 853/2004, la operaciones a las que se someta la carne tienen que impedir o reducir al mínimo la contaminación microbiana. Así la carne utilizada para la elaboración de

productos cárnicos frescos, se tiene que mantener a una temperatura inferior a 7 °C. La producción de carne picada a partir de carne refrigerada debe hacerse dentro de los 6 días siguientes al sacrificio. Finalmente, inmediatamente tras su preparación, la carne picada ha de refrigerarse a una temperatura interna no superior a 2 °C.

Los parámetros microbiológicos que se indican en la TABLA 2.2 son los que se deben considerar como referencia en los productos cárnicos picados, según el Reglamento (CE) N° 2073/2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

TABLA 2. 2. Parámetros microbiológicos de referencia en los productos cárnicos picados (Reglamento (CE) N°2073/2005).

Categoría de alimentos	Microorganismos	Plan de toma de muestras		Límites	
		n	c	m	M
2.1.6. Carne picada	Recuentos de colonias aerobias	5	2	5x10 ⁵ ufc/g	5x10 ⁶ ufc/g
	<i>E. coli</i>	5	2	50 ufc/g	500 ufc/g

ufc: unidades formadoras de colonias; n: número de unidades de componen la muestra; c: número de unidades de muestreo con valores superiores a m o comprendidos entre m y M; m: límite microbiológico que separa la calidad aceptable de la rechazable; M: los valores de recuentos microbianos superiores a M son inaceptables, el alimento representa un riesgo para la salud.

2.5. Estrategias para prolongar la vida útil de los productos cárnicos

La vida útil de un alimento, se define como el período de tiempo entre el envasado de un producto y su uso final, en el que las propiedades del producto siguen siendo aceptables para el consumidor (Lorenzo y Gómez, 2012).

La carne, debido a su alto contenido de actividad de agua y a su contenido en nutrientes, hace que sea un medio de cultivo perfecto para la proliferación de microorganismos, teniendo como consecuencia un corto período de vida útil, de 6 a 10 días (Gutiérrez et al., 2011).

Las hamburguesas y otros productos elaborados a partir de carne picada presentan una menor vida útil que la carne fresca entera y requiere la adición de conservantes para alargar el periodo de conservación más allá de 2-3 días, (Escalante et al., 2008, Pérez-Mateos et al., 2019). Esto se debe a que tiene una mayor superficie de contacto con el aire que le rodea, por lo que es más susceptible de sufrir rápidamente reacciones de oxidación. (Escalante et al., 2008). Al aumentar la superficie de contacto, todo el sustrato disponible es aprovechado por los microorganismos que logran proliferar por toda la superficie de manera homogénea (Monteagudo, 2018). Para evitar o minimizar lo expuesto anteriormente, es importante el empleo de antioxidantes.

2.5.1. Refrigeración

Se entiende por alimento refrigerado a “aquel que ha sido enfriado hasta la temperatura óptima de almacenamiento, de forma que en todos sus puntos aquella sea superior a la de su punto de congelación” (B.O.E., 1985)

Normalmente, en el caso de productos cárnicos, la refrigeración se combina con el envasado en vacío o el envasado en atmósferas modificadas.

2.5.2. Envasado en atmósferas modificadas

El envasado en atmósferas modificadas (EAM) o protectoras (EAP) implica instaurar una mezcla de gases definida alrededor del alimento dispuesto en un envase cerrado herméticamente, con el objetivo de inhibir o detener el progreso de agentes alterantes sin que lleguen a modificar las propiedades sensoriales del producto (Pereda, 2016).

Los gases más empleados son el oxígeno, dióxido de carbono y nitrógeno. El O₂ se emplea para dar estabilidad al color rojo brillante que proporciona la oximioglobina, no obstante hay que tener mucha cautela en la concentración en la que se emplea, puesto que en ciertas cantidades se favorecen las reacciones de oxidación de lípidos. El CO₂ inhibe el crecimiento de microorganismos aerobios debido a la disminución del pH y a su actuación en el sistema enzimático de los microorganismos, no así con las bacterias ácido lácticas (Martín, 2013), en las que favorece su proliferación; sin embargo, presenta el problema de poder originar el colapso del envase por su solubilidad en agua y grasa. Debido a ello hay que adecuar su concentración con el resto de los gases. El N₂

es un gas inerte con una baja solubilidad en agua y grasa, se emplea para desplazar al oxígeno y evitar el colapso por la absorción del CO₂, (Cabanillas, 2016).

Las carnes rojas frescas se suelen envasar con un 70-80% de oxígeno y entre 20% y 30% de dióxido de carbono. Esos niveles de oxígeno proporcionan un color estable de carne roja, haciéndolo atractivo para el consumidor. Sin embargo, niveles de CO₂ inferiores al 15% no inhiben satisfactoriamente el desarrollo de microorganismos y niveles superiores pueden provocar el colapso del envase debido a que lo absorbe el tejido de la carne. No obstante una alta concentración de oxígeno puede causar la oxidación de lípidos y proteínas conllevando una pérdida de la calidad de la carne (Lorenzo y Gómez, 2012).

2.5.3. Aditivos

Como se cita en el Reglamento (CE) N° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2008 sobre aditivos alimentarios, “un aditivo alimentario es toda aquella sustancia que normalmente no se consume como alimento en sí misma ni se use como ingrediente característico de los alimentos, tenga o no valor nutritivo, y cuya adición intencionada – con propósito tecnológico – a un alimento durante su fabricación, transformación, preparación, tratamiento, envasado, transporte o almacenamiento tenga por efecto, o quepa razonablemente prever que tenga por efecto, que el propio aditivo o sus subproductos se conviertan directa o indirectamente en un componente del alimento”.

Existen distintas clases funcionales de aditivos alimentarios (Reglamento (CE) N° 1333/2008, 2008), edulcorantes, colorantes, conservadores, antioxidantes, soportes, acidulantes, correctores de la acidez, antiaglomerantes, antiespumantes, agentes de carga, emulgentes, sales de fundido, endurecedores, potenciadores del sabor, espumantes, gelificantes, agentes de recubrimientos, humectantes, almidones modificados, gases de envasado, gases propelentes, gasificantes, secuestrantes, estabilizantes, espesantes y agentes de tratamiento de harinas.

El tipo de aditivo en el que se centra esta investigación son los antioxidantes, que son las “sustancias que prolongan la vida útil de los alimentos protegiéndolos del deterioro causado por la oxidación, como el enranciamiento de las grasas y los cambios de color” (Reglamento (CE) N° 1333/2008).

Los aditivos que se permiten añadir a los preparados de carne (“carne fresca, incluida la carne troceada, a la que se han añadido productos alimentarios, condimentos o aditivos, o que ha sido sometida a transformaciones que no bastan para alterar la estructura interna de la fibra muscular ni, por lo tanto, para eliminar las características de la carne fresca” (Reglamento (CE) N° 853/2004)) según indica el Reglamento (UE) 601/2014 son acetato potásico (E-261), acetato de sodio (E-262), ácido ascórbico (E-300), ascorbato sódico (E-301), ascorbato cálcico (E-302), lactato sódico (E-325), lactato potásico (E-326), ácido cítrico (E-330), citratos de sodio (E-331), citratos de potasio (E-332) y citratos de calcio (E-333), todos ellos en *quantum satis*.

Los aditivos normalmente se añaden para evitar o minimizar procesos de oxidación o actividad de microorganismos durante el almacenamiento y distribución (Garciano et al., 2017).

En la industria cárnica es muy importante el empleo de antioxidantes debido a que en el procesado de la carne y/o productos cárnicos, se van a dar una serie de fenómenos oxidativos que pueden generar cambios en el color, aroma, sabor y textura del producto, alterando así la calidad organoléptica del mismo (Armenteros et al., 2012). Para evitar esos cambios, tradicionalmente, se han empleado antioxidantes sintéticos como el butil-hidroxi-anisol (E-320) (BHA), butil-hidroxi-tolueno (E-321) (BHT), galato de propilo (PG) y terbutil-hidroquinona (TBHQ), (Armenteros et al., 2012). Estos tipos de antioxidantes sintéticos están siendo rechazados por los consumidores debido a su potencial toxicidad declarada (Munekata et al., 2020), puesto que cada vez hay más evidencia científica que demuestra que la carne procesada pueden aumentar el riesgo de enfermedad coronaria, diabetes tipo II y cáncer colorrectal (Shan et al., 2017; Shan et al., 2017).

Los aditivos de origen natural obtenidos química o biotecnológicamente son aquellos que si bien tienen un origen natural, se obtienen mediante procesos químicos o biotecnológicos por motivos económicos. En cualquier caso su composición química queda invariable (Vega, 2004).

En los últimos tiempos, la seguridad y aprobación, nivel de uso, tipo y aplicación de antioxidantes sintéticos y su regulación en la mayoría de los países es una de las principales preocupaciones, (Zhang et al., 2018). Debido a ello y a que hoy en día

los consumidores prestan una especial atención a la composición de los alimentos que ingieren, y concretamente a que éstos estén exentos de compuestos o aditivos que se perciben como compuestos químicos perjudiciales para la salud (Garciano et al., 2017). Cada vez es más habitual que los consumidores prefieran alimentos mínimamente procesados, y cuando escogen alimentos procesados, que contengan menor cantidad de aditivos o bien éstos sean aditivos considerados naturales (Carocho et al., 2014). Como consecuencia de ello, en la industria alimentaria se han introducido varios antioxidantes de origen vegetal como extractos de romero, clavo, orégano y salvia (Kim et al., 2013), hierbas, especias, extractos de uva, verduras y productos de semillas oleaginosas (Selani et al., 2011; Sampaio et al., 2012; Kim et al., 2013).

Existen antioxidantes naturales que se emplean con frecuencia para inhibir o reducir la oxidación de algunos alimentos, como el ácido ascórbico en los zumos de frutas para evitar el pardeamiento y los tocoferoles en aceites y emulsiones para evitar el enranciamiento (Durán, 2001).

En las últimas dos décadas se ha demostrado que los alimentos ricos en compuestos bioactivos como polifenoles, vitaminas, ácidos grasos omega-3 o fitoesteroles se pueden emplear como alimentos funcionales. La estabilidad en el alimento y la solubilidad de los compuestos biológicos son los factores que más afectan a la biodisponibilidad y las propiedades funcionales, que están potentemente influenciadas por parámetros como la luz, la temperatura, oxígeno, humedad o pH, (Delfanian y Sahari, 2020).

Como se ha comentado anteriormente, en la carne picada durante el procesado, se rompen las fibras musculares facilitando la interacción de los lípidos con los agentes prooxidantes, acelerando así el proceso de oxidación de los lípidos (De los Santos, 2018), por lo que la necesidad de aditivos que controlen estas reacciones es considerable.

Diferentes estudios avalan el efecto positivo de diferentes antioxidantes naturales en carne picada. El romero contiene un elevado nivel de polifenoles con una gran actividad antioxidante (Fernandez-Lopez et al., 2005). El empleo de romero en conjunto con ácido ascórbico fue eficaz en la inhibición de la oxidación de lípidos según el estudio de Sánchez-Escalante et al. (2001). De los Santos (2018) alargó la vida útil de

hamburguesas empleando romero y té verde como antioxidantes naturales. En el estudio llevado a cabo por Ortega (2015) se comprobó que se podían emplear extractos de hojas de *Agave vivipara* como antioxidante natural en hamburguesas de cerdo almacenadas a 4 °C durante 10 días. García (2017) observaron que el extracto de bagazo podría ser empleado para reducir la formación de hidroperóxidos en hamburguesas.

A excepción de este último estudio mencionado (García,2017), apenas hay investigaciones sobre el papel antioxidante del bagazo de cerveza y no se ha podido encontrar ningún trabajo científico en el que se añadiera a matrices alimentarias o concretamente, cárnicas, , Por todo ello, y considerando el potencial de los extractos de bagazo ya evidenciado en por otros autores y en un trabajo previo en nuestro laboratorio, se pretende con este Trabajo Fin de Máster, continuar con esta línea de investigación y comprobar el efecto antioxidante y antimicrobiano del extracto de bagazo liofilizado aplicado en hamburguesas de cerdo envasadas en atmósfera modificada y almacenadas bajo condiciones de refrigeración.

3. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

3. PLANTEAMIENTOS Y OBJETOS

El deterioro de la calidad de la carne y productos cárnicos se debe a distintos factores entre los cuales destaca el crecimiento microbiano, el deterioro de color y los fenómenos de oxidación (Domínguez et al., 2019). Estos procesos generan una serie de compuestos que afectan al aroma, textura y color de la carne, lo que puede llegar a suponer el rechazo del consumidor. Es por ello que las industrias agroalimentarias buscan nuevas tecnologías para prolongar la vida útil de los productos. Una de estas tecnologías es el envasado en atmósferas modificadas que combinado con bajas temperaturas de refrigeración se ajusta de mejor forma a la demanda de los consumidores.

Por otra parte, las industrias agroalimentarias generan una gran cantidad de residuos y subproductos que deben de ser revalorizados, para tener el menor impacto medioambiental posible y, de esta forma obtenerse paralelamente un beneficio tanto económico como nutritivo. A esta situación hay que añadir el hecho de que los consumidores optan cada vez más por la adquisición de productos considerados naturales, sin aditivos “artificiales”. Debido a ello, cada vez se realizan más estudios sobre compuestos presentes en los subproductos agroalimentarios generados por estas industrias, que puedan potencialmente sustituir a tales aditivos “artificiales”.

Las industrias cerveceras generan una gran cantidad de bagazo, que es subproducto resultante del filtrado. El extracto acuoso de bagazo es rico en compuestos antioxidantes, lo que se ha podido demostrar en investigaciones anteriores en nuestro laboratorio (Andrés et al., 2020), por lo en el presente trabajo, que es la natural continuación del anterior, se aplican extractos acuosos liofilizados de bagazo en un producto cárnico picado con el fin de alargar su vida útil durante su almacenamiento en refrigeración.

Por todo ello, los objetivos concretos de este Trabajo de Investigación son los siguientes:

- Determinar la capacidad para conservar el color rojo (parámetro a^*) del extracto acuoso liofilizado de bagazo de cerveza artesanal durante el almacenamiento de hamburguesas y comparar la eficacia del mismo con la del ascorbato sódico (E-301), empleado muy frecuentemente por las industrias cárnicas.

- Determinar la eficacia antioxidante del extracto acuoso liofilizado de bagazo de cerveza artesanal durante el almacenamiento de hamburguesas y comparar con la eficacia de un aditivo comercial normalmente utilizado, el ascorbato sódico (E-301).
- Determinar la eficacia antimicrobiana del extracto acuoso liofilizado de bagazo de cerveza aplicado en hamburguesas durante el periodo de almacenamiento envasadas en atmósferas modificadas y bajo condiciones de refrigeración y compararla con un aditivo comúnmente empleado, ascorbato sódico (E-301).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Reactivos

Los reactivos y productos químicos que se han empleado en esta investigación fueron suministrados por distintas marcas comerciales: galato de propilo (PG) Panreac (Barcelona, España), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) Scharlau (Sentmenat, España), ácido tricloacético (TCA) Panreac, (Barcelona, España), ácido tiobarbitúrico (TBA) (Darmstadt, Alemania), sodio dodecil sulfato Panreac, (Barcelona, España), 5,5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzoico) (DTNB) Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania), metanol absoluto (99,5%) Scharlau (Sentmenat, España).

4.2. Obtención de las muestras de carne

Las muestras de carne picada empleadas corresponden a la zona denominada informalmente “paleta” de cerdo blanco, procedentes de una carnicería local de Badajoz.

4.3. Obtención de los extractos de subproductos

Se obtuvo bagazo de cerveza, donado por la Cervecería Artesana Natural Extremeña Ballut, ubicada en la ciudad de Badajoz. El bagazo se obtuvo del proceso de elaboración de cerveza de trigo en la que se emplearon maltas de trigo y cebada a partes iguales, dos tipos de lúpulo, semilla molturada de cilantro, piel de naranja y levadura W06.

La composición química del bagazo empleado se puede observar en la TABLA 4.1.

TABLA 4.1. Composición química del bagazo obtenido después de la elaboración de la cerveza de trigo en porcentaje (%) (Fuente: Elaboración propia).

Humedad	Grasa	Proteínas	Fibra	Cenizas
75,00±0,20	39,40±0,15	20,42±0,12	7,10±0,70	1,15±0,10

Una vez obtenido el bagazo, éste se congeló rápidamente a -20°C para evitar su fermentación. Para poder llevar a cabo las determinaciones químicas del bagazo, se descongeló y se desecó hasta alcanzar una humedad de 6,25%, en una estufa de desecación (Selecta modelo CONTERM 80L, Badajoz, España) a la temperatura de 100°C y durante un período de tiempo de 10 horas. Tras ello se guardaron las muestras en bolsas de polietileno, se sellaron y se almacenaron en un lugar oscuro y seco para la posterior extracción.

La extracción se realizó con agua destilada, en las condiciones de tiempo, temperatura y relación sólido/líquido consideradas óptimas según una investigación anterior realizada (Andrés et al., 2020). Dichas condiciones fueron, 30°C al baño maría en agitación constante durante 121,9 minutos y con un ratio de 10 mL de agua por cada gramo de bagazo. Para aumentar el rendimiento de la extracción se aplicaron ultrasonidos durante todo el proceso de obtención del extracto (Ultraschall seit 1955, Bandelin, Berlín, Alemania).

Una vez terminada la extracción, la mezcla de agua destilada y bagazo se filtró empleando un tamiz con un tamaño de poro de $45\ \mu\text{m}$ (Filtru, Badalona, España) y se liofilizó (Telstar, Lyobeta, Barcelona). El liofilizado resultante, mostrado en la FIGURA 4.1, se guardó en vasos de plástico (Anaclin S.L., Madrid), que se sellaron con parafilm y se guardaron en oscuridad, para preservar la actividad antioxidante, hasta su utilización.



FIGURA 4. 1. De izquierda a derecha: bagazo liofilizado en bandeja y bagazo liofilizado envasado para su posterior uso en la investigación. (Fuente: Elaboración propia)

4.4. Preparación y envasado de las muestras

Se obtuvieron 4 lotes experimentales compuestos cada uno por 6 muestras que se analizaron en 3 días diferentes, haciendo un total de $n=72$; un lote control negativo

(CONTROL-) al que no le adicionó extracto, un lote control positivo (CONTROL+) al que se le adicionó 1000 mg de ácido ascórbico por cada kg de carne, un lote BSG 1000 al que se le añadió 1000 mg de bagazo liofilizado por cada kg de carne y un lote BSG 3000 al que se le añadió 3000 mg de bagazo liofilizado por cada kg de carne. Dichos extractos se añadieron y mezclaron con la carne picada. Para cada lote se empleó 5 mL de agua por cada 100 gramos de carne.

Se emplearon 4 boles de acero inoxidable en los que se incluyeron 2 kg de carne en cada uno. Cada uno de ellos representaba un lote, en los que se mezcló la carne picada, los extractos y el agua, necesarios para cada lote, como se ha explicado en el párrafo anterior.

Una vez conseguida una mezcla homogénea, se procedió a la formación de las hamburguesas en una hamburguesadora (Mainca modelo MH-100, Barcelona, España). Las hamburguesas ya formadas, se pesaron en una balanza para controlar que pesaran alrededor de 80 g. Se hicieron 24 hamburguesas de cada lote, para poder realizar la toma de muestras en 3 días diferentes. Posteriormente, se envasaron las hamburguesas en barquetas de polipropileno (130x160x50 mm³, Sarabia Plastics, Alicante) y se sellaron con una película de poliéstermetilcelulosa PLPMC (Wipack, Hamburgo, Alemania) con permeabilidad al oxígeno de 114cm³/cm²/24 horas, empleando un equipo de envasado (Smart 500, ULMA, Sevilla, España) para poder introducir una mezcla de gases en cada envase de concentración 70% O₂ y 30% CO₂. Los envases se almacenaron en una cámara frigorífica con temperatura de 4 °C. Las muestras fueron tomadas a los días 0, 4 y 9 de almacenamiento para su análisis. Éste consistió en un análisis microbiológico (n=3) y un análisis físico-químico, empleando la otra mitad de las muestras de cada lote (n=3). El resto de muestras se envasaron a vacío en bolsas y se almacenaron en congelación a una temperatura de 80 °C bajo cero para su posterior análisis.

4.5. Análisis de las características físico-químicas de las muestras

Todas las determinaciones se realizaron en los días 0, 4 y 9 de almacenamiento en refrigeración.

4.5.1. Análisis de las mermas durante el almacenamiento

Las hamburguesas se pesaron el día de su elaboración, día 0 y en los 4 y 9 días posteriores de su almacenamiento en refrigeración para poder calcular la pérdida de peso, expresada en porcentaje (%).

4.5.2. Determinación de la humedad

La determinación de la humedad se realizó según el método descrito por la Norma ISO-1442. Se emplearon cápsulas de porcelana desecadas en una estufa a una temperatura de 105°C. Se mantuvieron en un desecador a temperatura ambiente para conseguir su atemperado y fueron pesadas en la balanza de precisión (1-2 gramos). Una vez pesadas, fueron introducidas de nuevo en la estufa a la misma temperatura indicada anteriormente, y se dejó hasta pesada constante (24 horas). Para ver la pérdida de humedad se repitió el proceso, se sacaron las cápsulas de la estufa y se dejaron atemperar en un desecador para su posterior pesada en la balanza de precisión. El cálculo de la humedad se realizó por la diferencia de pesada entre el peso inicial de la cápsula y el peso final de la cápsula más la muestra desecada.

4.5.3. Análisis de la evolución de la composición de gases en el espacio de cabeza

La composición de gases resultante del espacio de cabeza de cada envase se midió con un analizador de gases (Checkpoint, PBI Dansensor). Se introdujo la sonda del equipo en cada bandeja, a través de la película de PLPMC.

4.5.4. Determinación de pH

El pH se determinó empleando un pH-metro de punción (HANNA, model HI 99136, USA)

4.5.5. Evaluación instrumental del color

La medición del color se realizó sobre la superficie de las hamburguesas tras la apertura de las bandejas, de acuerdo con las recomendaciones de determinación de color de la AMSA (2011)

Se hicieron tres medidas en áreas diferentes de la superficie de la hamburguesa, determinando las coordenadas de luminosidad (L^*), intensidad del color rojo (a^* , rojo \pm

verde) e intensidad del color amarillo (b^* , amarillo \pm azul), empleando un colorímetro de reflectancia (Minolta Chroma Meter Measuring HeadCR-300equipped with Data Processor DP-301, Minolta, Osaka Japan).

4.5.6. Determinación del grado de oxidación lipídica

El propósito del análisis es cuantificar las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico reactivo (TBA reactive substances, TBARS). Esos compuestos son principalmente los procedentes de la oxidación de lípidos (aldehídos principalmente). El producto de la reacción forma un pigmento rojo con absorbancia máxima a 532 nm (Sorensen y Jorgensen, 1996).

El método utilizado (Sorensen y Jorgensen, 1996) consistió en pesar 5 gramos de la muestra de hamburguesas en tubos de centrífuga donde se les añadieron 15 mL de solución TCA al 7.5% con PG (propilato) al 0.1% y EDTA al 0.1% (Ácido etilendiaminotetraacético). Tras ello se mezcló en un homogeneizador (Ultra turrax, SORVAL OMNIMIXER, Nueva York, US), durante 45 segundos a un nivel 4. Una vez que la mezcla quedó homogeneizada se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos y a 2 °C (EPPENDORF mod. Centrifuge5810-R, Berlín, Alemania). Finalizada la centrifugación se procedió a extraer 3 mL del sobrenadante de cada muestra y se traspasó por duplicado a un tubo Kimax adicionándole finalmente 3 mL de la solución de TBA (0,02 M) preparada en el mismo día. Los tubos fueron agitados y se incubaron en baño maría a 100 °C durante 40 minutos para que tuviera lugar la reacción. Posteriormente, se sacaron los tubos, se enfriaron y se metieron en una batea con hielo para mantener temperatura de refrigeración. Por último se midió la absorbancia a 532 y 600 nm utilizando un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, mod. Biomate 3, Madison, US)).

4.5.7. Determinación del grado de oxidación proteica

El grado de oxidación proteica fue estimado midiendo el contenido en grupos tioles libres, siguiendo el método descrito por Batifoulier (2002). Para ello, se pesó 2 g de muestra triturada en tubos de centrífuga en la balanza de precisión y fueron homogeneizadas en 10 mL de tris buffer 1 (solución formada por 2,4228 g por L de agua destilada, de pH 7,4), en el homogeneizador (Ultra turrax SORVAL OMNIMIXER, Nueva York, US) en frío a velocidad 4 durante 1 minuto.

Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se tomaron 250 µL del sobrenadante, al cual se añadió 750 µL de tris buffer 2 (solución formada por 12,114 g de Tris, 0,2326 g de etilendiaminatetraacético (EDTA), 5 g de sodio dodecil sulfato por 500 mL de agua destilada, de pH 8,4), 50 µL de 5,5'- Ditiobis (2-ácido nitrobenzoico) 0,01 M (DTNB) y 3950 µL de metanol absoluto. Seguidamente, las muestras se agitaron en agitatuos y se dejaron en reposo durante 15 minutos para la estabilización del color, se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Finalmente, se midió la absorbancia a 412 nm, para ello contra un blanco con 250 µL de tris buffer 1 en lugar de sobrenadante de la muestra.

4.5.8. Análisis microbiológico

El análisis microbiológico de las muestras se llevó a cabo en una campana de flujo laminar en el laboratorio de INTAEX. Los recuentos microbiológicos se realizaron partiendo de 10 gramos de muestra tomados asépticamente, e introducidos en bolsas Stomacher. A las muestras se les añadieron 90 mL de agua de peptona al 1% (Sharlab) y se homogeneizaron en un Stomacher. Con dichas bolsas, provistas de filtros, se realizaron 8 diluciones decimales en agua de peptona al 1%, a partir de las cuales se realizaron las siembras en los diferentes medios de cultivos, según el tipo de microorganismo a determinar. Para la determinación de aerobios psicrófilos se empleó una temperatura de incubación de 4 °C. Para el recuento de Enterobacterias se procedió a la siembra en superficie, empleando una varilla de vidrio acodada, de 0.1 mL de cada una de las diluciones sobre el medio selectivo VRBG, incubándose a 30 °C durante 24 horas para su posterior recuento. Por último, para el recuento de bacterias ácido-lácticas se empleó el medio MRS, tras su siembra se incubó a 37 °C durante 48 horas en condiciones anaeróbicas.

Los recuentos se expresaron como Log_{10} de las unidades formadoras de colonias (UFC).

4.5.9. Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como media \pm error estándar de la media para los lotes en estudio. Los datos obtenidos se analizaron empleando el análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) utilizando el programa SPSS v.15.0 (SPSS Institute Inc., Cary, NC) con la finalidad de evaluar el efecto de la adición de los

extractos y el efecto del almacenamiento en condiciones de refrigeración de las muestras de carne picada. En los casos en los que el efecto de algunas de estas variables independientes fue significativo, las medias se compararon mediante prueba de Tukey ($p < 0.05$)

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Evolución del contenido de O₂ y CO₂ de gases en el espacio de cabeza y merma de peso, contenido de humedad y pH

En la TABLA 5.1 se presentan los valores de porcentaje de O₂, CO₂ y humedad, así como el pH y mermas de peso (%) durante los 9 días de almacenamiento de las hamburguesas.

TABLA 5. 1. Efecto del tiempo de almacenamiento y extracto añadido en parámetros generales de hamburguesas de cerdo frescas envasadas en MAP y almacenadas durante 9 días en refrigeración (4 ± 1°C).

Día	LOTE	% O ₂	% CO ₂	% Humedad	pH	%mermas
0	BSG 1000	68,66±0,87 ¹	31,34±0,34 ³	73,63±0,76 ¹	4,94±0,04b ²	-
	BSG 3000	68,73±0,23 ¹	31,27±0,98 ³	73,59±0,34 ¹	5,22±0,05a ²	-
	CONTROL-	67,33±0,76 ¹	32,67±0,54 ³	73,45±0,32 ¹	4,90±0,03c ²	-
	CONTROL+	68,01±0,89 ¹	31,99±0,71 ³	73,38±0,45 ¹	5,27±0,00a ²	-
	P _{lote}	ns	ns	ns	***	-
4	BSG 1000	56,00±1,19 ²	36,90±0,93b ²	72,06±0,04c ¹	5,07±0,05b ²	1,71±0,02b
	BSG 3000	56,43±1,07 ²	37,67±0,15a ²	73,54±0,10a ¹	4,92±0,05c ³	1,00±0,01c
	CONTROL-	57,93±1,69 ²	33,77±0,85c ²	72,15±0,07c ²	5,08±0,01b ¹	1,93±0,04a
	CONTROL+	57,27±1,15 ²	36,63±0,59b ²	72,83±0,04b ²	5,31±0,00a ²	1,02±0,08c
	P _{lote}	ns	*	*	***	**
9	BSG 1000	51,37±1,11 ³	42,17±0,73a ¹	70,31±0,02a ²	5,52±0,06a ¹	4,46±0,03
	BSG 3000	51,57±0,70 ³	42,80±0,50a ¹	70,15±0,09ab ²	5,46±0,05b ¹	4,67±0,28
	CONTROL-	50,50±0,55 ²	38,00±1,24c ¹	70,06±0,06b ³	5,20±0,07c ¹	4,44±0,15
	CONTROL+	53,30±1,10 ³	40,50±0,42b ¹	70,03±0,04b ³	5,51±0,03a ¹	4,63±0,06
	P _{lote}	*	*	*	**	ns

CONTROL- (hamburguesa sin extracto agregado); CONTROL+ (hamburguesa con 1000 mg ascorbato sódico/kg carne); BSG 1000 (hamburguesa con 1000 mg de extracto de bagazo liofilizado por kg de carne); BSG 3000 (hamburguesa con 3000 mg de extracto de bagazo liofilizado por kg de carne).

a-c, los valores con letras diferentes en el mismo día de almacenamiento son significativamente diferentes debido al efecto lote (p <0.05); 1-2-3, los valores con diferentes números en el mismo lote son significativamente diferentes debido al efecto día de almacenamiento (p <0.05). Niveles significativos: ns: no significativo; *: P <0.05; **: P <0.01; ***: P <0.001.

El contenido de oxígeno en el espacio de cabeza de los envases se redujo significativamente (P<0,05) desde contenidos iniciales de 67,33-68,73% hasta 50,50-53,50% después de 9 días de almacenamiento. Por el contrario, el contenido de CO₂ aumentó, también significativamente (P<0,05), durante el periodo de refrigeración

desde valores iniciales de 31,27-32,67% hasta 38,00-42,80%. El oxígeno es un gas muy reactivo por lo que durante el almacenamiento de los alimentos y de la carne en concreto, puede intervenir en el proceso de oxidación de las grasas, mioglobina, etc. (Zakrys-Waliwander et al., 2012). Considerando esta información, la evolución del contenido de oxígeno en todos los lotes del presente trabajo es lógica y de hecho coincide con los resultados de trabajos previos realizados en nuestro laboratorio (Andrés et al., 2017) y por otros autores (Bolumar, 2016, Esmer, 2017; Jiménez, 2018, Baltasar et al., 2019). El CO₂ es el subproducto del metabolismo de bacterias ácido-lácticas (Adams et al., 2015), por lo que atendiendo a los resultados obtenidos del análisis microbiológico mostrados en la TABLA 5.4, que se comentarán en el apartado 5.4, es esperable que los porcentajes de CO₂ aumenten en el tiempo de almacenamiento como así ha ocurrido y puede observarse en la TABLA 5.1. De hecho, se ha calculado una correlación significativa positiva entre el contenido de CO₂ y el recuento de microorganismos ácido-lácticos ($R^2=0,924$; $P<0,001$). Estos resultados obtenidos coinciden con otras investigaciones (Esmer, 2017).

Respecto a las diferencias entre lotes, la adición de ascorbato sódico (CONTROL+) o extractos de bagazo (BSG 1000 y BSG 3000) no afectó de forma significativa al porcentaje de oxígeno en el espacio de cabeza de los envases ($P>0,05$), a excepción del día 9 de almacenamiento, donde se puede observar que las hamburguesas sin aditivos tuvieron el porcentaje de oxígeno más bajo ($P<0,05$).

Respecto al CO₂, este mostró porcentajes más elevados en lotes de hamburguesas con extractos de bagazo, después de 4 y 9 días ($P<0,05$).

En cuanto al contenido de humedad de las muestras de hamburguesas empleadas en este estudio, este parámetro disminuyó de forma significativa ($P<0,05$) desde valores iniciales de 73,38-73,63% hasta valores finales de 70,03-70,31%. Esta evolución coincide con otros trabajos de investigación previos (Calderón, 2015; Jiménez, 2018) y se traduce en pérdidas de peso (mermas) de las hamburguesas durante el almacenamiento, que además fueron más intensas después de 9 días, coincidiendo con el parámetro humedad. La pérdida de humedad de la carne puede causar pérdida de peso en las hamburguesas (Cabo de Castro et al., 2009). En la TABLA 5.1 puede observarse que los porcentajes de mermas después de 4 días variaron entre 1,00 y 1,73% y fueron sustancialmente superiores, 4,44 y 4,46%, después de 9 días.

Respecto a los tratamientos aplicados, si bien se observa un efecto significativo sobre la humedad, lo cierto es que no se aprecia una tendencia consistente. Después de 4 días, fue el lote BSG 3000 (3000 mg extracto de bagazo liofilizado/kg carne) el que presentó mayores valores de humedad ($P < 0,05$), mientras que después de 9 días, este fue el lote BSG 1000 ($P < 0,05$).

Ramírez-Rojo et al. (2019) observaron que la adición de extractos de hojas de mezquite (*Prosopis velutina*) no influyó en el contenido de humedad en hamburguesas de cerdo; al igual que Rodríguez-Carpena et al. (2011), empleando extractos de piel y semillas de aguacate como antioxidante natural en hamburguesas de cerdo, o Soriano et al. (2018) en hamburguesas de cerdo con extractos de madera de roble. No se han encontrado trabajos de investigación en los que se haya utilizado extracto de bagazo cervecero en hamburguesas, por lo que no es posible la comparación de resultados.

Considerando la relación entre humedad y mermas, no sorprende que el porcentaje de mermas también se viera afectado por la adición de extractos, al menos después de 4 días ($P < 0,05$). De hecho, fue el lote BSG 3000 el que presentó las menores mermas después de 4 días ($P < 0,05$), y el lote BSG 1000 (1000 mg extracto de bagazo liofilizado/kg carne) lo fue después de 9 días, si bien no de forma estadísticamente significativa ($P > 0,05$). El coeficiente de correlación entre el porcentaje de humedad y de mermas fue de $R^2 = -0,985$, $P < 0,001$.

Los valores de pH oscilaron desde valores iniciales de 4,94-5,27 hasta valores finales de 5,20-5,52 pudiéndose observar un aumento significativo de este parámetro durante el tiempo de almacenamiento ($P < 0,05$). Los valores de pH estuvieron durante todo el experimento por debajo de 6,00, siendo normal para las hamburguesas de carne (Andrés et al., 2017; Zamuz et al., 2018). El aumento del pH a lo largo del almacenamiento puede deberse a la presencia de compuestos básicos y nitrógeno formado durante la proteólisis debida al aumento de bacterias (Muthukumar et al., 2014; Boskovic, 2017), aumento que efectivamente tuvo lugar de forma significativa en este trabajo de investigación, como se comentará en el apartado 5.4. De hecho, se ha calculado una correlación estadísticamente significativa entre el valor pH y el recuento de microorganismos Enterobacterias totales, Psicrófilos y Bacterias ácido lácticas ($R^2 = 0,618$; 0,545 y 0,530, respectivamente, $P < 0,001$). Los resultados de pH obtenidos concuerdan con los reportados por Gao et al. (2019) que observaron un aumento de pH

en hamburguesas tratadas con extracto de romero tras 5 días de almacenamiento. Por el contrario, Andrés et al. (2017), Pateiro et al. (2018), Soriano et al. (2018), Šojić (2020) Zamuz et al. (2018) y Ramírez-Rojo et al. (2019) reportaron una disminución de los valores del pH durante el almacenamiento, lo que podría estar debido a un aumento de bacterias ácido lácticas (Pateiro et al., 2018; Zamuz et al., 2018) o por la acidificación causada por el ácido carbónico formado al difundirse el dióxido de carbono y reaccionar este con el agua de las hamburguesas (Soriano et al., 2018).

En cuanto al efecto del tratamiento aplicado en las muestras, después de 4 días de almacenamiento pudo verse que el lote BSG 3000 fue el que menor valor de pH presentó y el lote CONTROL+ (con ascorbato sódico) el de mayor pH ($P < 0,001$). Después de 9 días, el efecto fue diferente, siendo el lote CONTROL- el que menos pH y BSG 1000y CONTROL+ el de mayor pH. Las hamburguesas tratadas con antioxidantes mostraron un pH mayor que las que no tuvieron ningún tipo de tratamiento (CONTROL-), coincidiendo con los resultados obtenidos por Ifesan et al. (2009) y Andrés et al. (2017). Ramírez-Rojo et al. (2019) observaron que hamburguesas tratadas con extracto de hoja de mezquite presentaron valores de pH más elevados que las tratadas con antioxidantes sintéticos, ácido ascórbico y BHT. Zamuz et al. (2018) reportaron que los extractos de castañas en hamburguesas provocaron una disminución de pH en hamburguesas (indicaron una disminución de los valores del pH explicándolo como la consecuencia de la acción de las bacterias ácido lácticas). Por el contrario, Lorenzo et al. (2014) demostraron en su investigación con extractos de té, uva, castaña y algas aplicados en hamburguesas de cerdo, que la adición de estos extractos no tuvieron diferencias significativas, obteniendo valores más bajos aquellas hamburguesas tratadas con extracto de té, uva y BHT que las tratadas con castaña y algas.

No se han encontrado trabajos de investigación en matrices cárnicas en los que se haya añadido extractos de bagazo liofilizado de cerveza, por lo que es complicado comparar los resultados obtenidos.

5.2. Medición instrumental del color

En la TABLA 5.2 se pueden observar la evolución de los parámetros de color en las hamburguesas durante los días de almacenamiento de las muestras sin la adición de extracto (CONTROL-), con la adición de ascorbato sódico (CONTROL+) y con la adición de los extractos de bagazo (BSG 1000 y BSG 3000).

TABLA 5. 2. Efecto del tiempo de almacenamiento y extracto añadido en color medido instrumentalmente en hamburguesas de cerdo frescas envasadas en MAP y almacenadas durante 9 días en refrigeración ($4 \pm 1^\circ\text{C}$).

Día	LOTE	L*	a*	b*
0	BSG 1000	48,74±1,71 ²	11,73±0,60 ¹	12,94±0,62
	BSG 3000	51,45±3,55	10,63±1,40 ¹	11,71±0,46
	CONTROL-	50,67±1,87 ²	11,67±0,84 ¹	13,36±0,32
	CONTROL+	45,08±2,00	13,90±1,43 ¹	12,84±0,79
	P _{lote}	ns	ns	ns
4	BSG 1000	56,24±1,49a ¹	7,73±0,45b ²	12,16±0,90
	BSG 3000	53,35±0,31b	6,63±0,33c ²	11,47±1,44
	CONTROL-	54,56±1,01b ^{1,2}	7,67±0,30b ²	13,00±0,91
	CONTROL+	46,66±0,55c	9,90±0,36a ²	14,53±0,35
	P _{lote}	**	***	ns
9	BSG 1000	56,12±0,72a ¹	4,93±0,12b ³	13,39±0,38
	BSG 3000	54,71±1,44b	4,35±0,53c ³	15,12±0,64
	CONTROL-	57,52±1,56a ¹	4,21±0,28d ³	14,06±0,61
	CONTROL+	49,07±0,58c	5,55±0,17a ³	12,37±0,08
	P _{lote}	**	*	*

CONTROL- (hamburguesa sin extracto agregado); CONTROL+ (hamburguesa con 1000 mg ascorbato sódico/kg carne); BSG 1000 (hamburguesa con 1000 mg de extracto de bagazo liofilizado por g de carne); BSG 3000 (hamburguesa con 3000 mg de extracto de bagazo liofilizado por kg de carne).

a-c, los valores con letras diferentes en el mismo día de almacenamiento son significativamente diferentes debido al efecto lote ($p < 0.05$); 1-2-3, los valores con diferentes números en el mismo lote son significativamente diferentes debido al efecto día de almacenamiento ($p < 0.05$). Niveles significativos: ns: no significativo; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

Los valores de luminosidad medida instrumentalmente en la superficie de las hamburguesas aumentaron desde valores iniciales de 45,08-51,45 hasta 49,07-57,52. No obstante este aumento no fue estadísticamente significativo en todos los lotes, solo para el lote CONTROL - (sin aditivo) en el día 4 de almacenamiento. De forma similar Pateiro et al. (2018) demostraron en su estudio con extractos de semillas de guaraná en hamburguesas que la luminosidad apenas se vio afectada durante el almacenamiento aunque se tuvo un pequeño aumento de los valores del parámetro L*, lo que podría estar relacionado con las reacciones de oxidación y la disponibilidad de agua en la superficie.

Franco et al (2012) demostraron que el valor L^* aumento durante el tiempo de almacenamiento de filetes de res tratadas con extractos de romero y semilla de uva. Andrés et al, (2017), en su investigación con subproductos de tomates aplicado a carne de cordero, reportaron que los valores de L^* aumentaron de forma significativa durante el almacenamiento. Sin embargo, Andrés et al. (2017) observaron que el parámetro L^* tuvo una tendencia decreciente durante el almacenamiento de hamburguesas tratadas con extractos de tomate, subproductos de uva tinta, aceituna y granada. Zamuz et al. (2018) demostraron que los valores de luminosidad disminuyeron durante todo el almacenamiento en su investigación con extractos de cáscara, fresa y hojas de castaña en hamburguesas, y De los Santos (2018) y Soriano et al. (2018) en sus estudios de adición de romero y té verde y extractos de madera de roble en hamburguesas, respectivamente, observaron que el parámetro L^* se mantenía constante a lo largo del tiempo de almacenamiento.

Respecto al índice de color rojo (a^*), se aprecia que éste disminuyó significativamente en todos los lotes de forma significativa ($P < 0,05$), desde los valores iniciales 10,63-13,90 hasta 4,21-5,55. No se aprecian, sin embargo diferencias significativas respecto al parámetro b^* ($P > 0,05$). El parámetro a^* está relacionado con la capacidad enzimática reductora de la carne, para retrasar la formación de metamioglobina así como con la oxidación lipídica (De los Santos, 2018), lo que explica que el CONTROL+ (con 1000 mg ascorbato sódico/kg carne) presentara coloraciones más rojas. De hecho, en este trabajo se ha observado que el índice a^* se correlaciona negativa y significativamente con los valores de oxidación lipídica (TBARS) ($R^2 = 0,785$, $P < 0,001$).

En relación al efecto de la adición de extractos, el lote CONTROL+ con 1000 mg de ascorbato sódico/kg de carne y el lote CONTROL- (sin ningún aditivo), tuvieron los mayores valores de L^* . Por otra parte, la intensidad del color rojo (a^*), resultó también afectada por el tipo de tratamiento dado a la hamburguesa. El lote CONTROL+ fue el que presentó valores más elevados de a^* después de 4 y 9 días de almacenamiento ($P < 0,05$) y el lote sin aditivos (CONTROL-), el que menos intensidad de color rojo presentó después de 9 días de almacenamiento ($P < 0,05$).

Aunque los lotes BSG 1000 (1000 mg extracto de bagazo liofilizado/kg carne) y BSG 3000 (3000 mg extracto de bagazo liofilizado/kg carne) presentaron valores más

bajos del parámetro a^* que el lote CONTROL+, aquellos presentaron valores más elevados que el lote CONTROL- (sin aditivo), por lo que se pudo demostrar su capacidad conservante del color. Ramírez-Rojo et al. (2019) obtuvieron mejores valores para el parámetro a^* en las hamburguesas tratadas con extractos de semilla de guaraná que aquellas tratadas con BHT, lo que atribuyeron a una menor oxidación del átomo de hierro del grupo hemo y por lo tanto una menor formación de metamioglobina. De la misma manera, Zamuz et al. (2018) demostraron que las hamburguesas con extractos obtuvieron mejores resultados que las tratadas con BHT. De los Santos (2018) obtuvo resultados similares, al lograr mejores valores de color rojo para las hamburguesas tratadas con extracto de té verde. Otra investigación, la realizada por Rodríguez-Carpena et al. (2011), comprobó que las hamburguesas tratadas con extractos de piel y semilla de aguacate mostraron una mejor conservación de color.

5.3. Estabilidad oxidativa de lípidos y proteínas

En la TABLA 5.3 se muestran los valores de oxidación lipídica expresada en mg MDA/kg de carne y de oxidación proteica expresada en nmol tiol/mg proteína.

TABLA 5. 3. Efecto del tiempo de almacenamiento y extracto añadido sobre la estabilidad oxidativa en hamburguesas de cerdo frescas envasadas en MAP y almacenadas durante 9 días en refrigeración ($4 \pm 1^\circ\text{C}$).

Día	LOTE	mg MDA / kg carne	nmol tiol/mg prot
0	BSG 1000	0,035±0,002 ²	296,94±10,96
	BSG 3000	0,032±0,001 ³	291,28±8,57
	CONTROL-	0,031±0,003 ²	311,27±8,57
	CONTROL+	0,032±0,003	303,62±7,52
	P _{lote}	ns	ns
4	BSG 1000	0,200±0,017b ¹	253,85±20,60
	BSG 3000	0,182±0,032c ²	273,08±16,33 ^{1,2}
	CONTROL-	0,247±0,036a ¹	250,37±29,71
	CONTROL+	0,047±0,002d ¹	247,85±10,92
	P _{lote}	**	ns
9	BSG 1000	0,198±0,011c ¹	200,53±30,45
	BSG 3000	0,321±0,026a ¹	240,34±4,92
	CONTROL-	0,280±0,011b ¹	233,14±9,41
	CONTROL+	0,054±0,002d ¹	263,52±12,41
	P _{lote}	***	ns

CONTROL- (hamburguesa sin extracto agregado); CONTROL+ (hamburguesa con 1000 mg ascorbato sódico/kg carne); BSG 1000 (hamburguesa con 1000 mg de extracto de bagazo liofilizado por kg de carne); BSG 3000 (hamburguesa con 3000 mg de extracto de bagazo liofilizado por kg de carne).

a-c, los valores con letras diferentes en el mismo día de almacenamiento son significativamente diferentes debido al efecto lote ($p < 0.05$); 1-2-3, los valores con diferentes números en el mismo lote son significativamente diferentes debido al efecto día de almacenamiento ($p < 0.05$). Niveles significativos: ns: no significativo; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

En cuanto a la evolución lipídica en los diferentes lotes a lo largo de los 9 días de almacenamiento en refrigeración, se observó el aumento significativo ($P < 0,05$) en todos los lotes, desde valores de 0,031-0,035 mg MDA/kg carne hasta valores finales de 0,054-0,321 mg MDA/kg carne. Esta evolución es esperable debido a las reacciones de oxidación que se dan en el almacenamiento, más aun cuando los porcentajes de oxígeno son tan elevados como en el presente estudio. Esta evolución ascendente ha sido reportada en multitud de trabajos de investigación centrados en hamburguesas almacenadas en atmósferas modificadas en distintas condiciones (Jia et al., 2012; Lorenzo et al., 2014; Villalobos-Delgado et al., 2015; Andrés et al., 2017; Andrés et al., 2017; Zamuz et al., 2018). Respecto al efecto de los distintos tratamientos sobre la

oxidación lipídica, en la TABLA 5.3 puede observarse que el lote que menos reacciones de oxidación sufrió fue el lote CONTROL+ (1000 mg ascorbato sódico/kg carne) y el que se oxidó de forma más intensa fue el lote CONTROL- (sin adición de ningún aditivo o extracto), lo cual entra dentro de los resultados esperables. El ascorbato sódico participa en las reacciones redox donando electrones terminando la propagación de las reacciones de los radicales libres, y por tanto, inhibiendo la oxidación de lípidos (Berardo et al., 2016). Existe diversa bibliografía en la que, al igual que en el presente trabajo de investigación, se demuestra el efecto antioxidante del ascorbato sódico (Soriano et al., 2018; Ramirez-Rojo et al., 2019; Librea et al., 2020). De hecho, el ascorbato sódico se utiliza como aditivo (E-301) permitido en productos cárnicos y es uno de los más utilizados actualmente.

Por otra parte, los lotes de hamburguesas con extracto de bagazo añadido (BSG 1000 y BSG 3000) fueron eficaces para reducir la oxidación lipídica frente al lote CONTROL- en el día 4 de almacenamiento. Esta eficacia se debe a la presencia de compuestos fenólicos en los extractos, lo que permite inhibir la formación y propagación de radicales libres (Rodríguez-Carpena et al. 2011; Mariem et al., 2014, Zhang et al., 2016; Andrés et al., 2017; Lorenzo et al., 2018). No obstante la adición de 1000 o 3000 mg/kg fue menos efectiva para reducir la oxidación lipídica que la adición de ascorbato sódico después de 9 días ($P < 0,001$). Este resultado pudo observarse en otras investigaciones previas (Andrés et al., 2017; Zamuz et al., 2018), donde también observaron una mayor eficacia de ascorbato sódico en comparación con extractos de tomate, uva tinta, aceitunas y granada y extractos de castaña, respectivamente, añadidos a hamburguesas. Por el contrario, existen estudios en los que se ha demostrado que hamburguesas tratadas con extractos naturales mostraron mayor capacidad antioxidante frente a las tratadas con ascorbato sódico (Soriano et al., 2018) o frente a las tratadas con BHT o BHA (Lara et al., 2011; Jia et al., 2012; Lorenzo et al., 2013; Pateiro et al., 2018; Ramirez-Rojo et al., 2019). De diferente manera, Andrés et al. (2017) no vieron efecto antioxidante de los extractos de subproductos de tomate en carne de cordero. No se ha podido encontrar trabajos de investigación con extractos de bagazo añadidos a hamburguesas y otros productos cárnicos, por lo que no es posible realizar una comparación más concreta de los resultados de la oxidación lipídica. No obstante, hay que destacar que estos resultados demuestran, que la adición de extracto de bagazo obtenido mediante el sistema de extracción desarrollado en un trabajo de investigación

anterior en nuestro laboratorio (Andrés et al., 2020) es eficaz para controlar las reacciones de oxidación lipídica en un producto cárnico como hamburguesa, almacenado en refrigeración. Por otra parte, resulta reseñable que el lote BSG 3000 presentó menor oxidación lipídica que el lote BSG 1000, mientras que después de 9 días de almacenamiento, ocurrió lo contrario, el lote BSG 1000 frenó de forma más eficaz la oxidación lipídica frente al lote BSG 3000, en el que los valores de oxidación lipídica fueron más elevados. El efecto prooxidante de algunos compuestos *a priori*, antioxidantes, ya ha sido evidenciado en estudios previos en matrices cárnicas, en los cuales se han empleado extracto de ajo o aceite esencial de ajo (Nieto et al., 2012; Paula, 2017; Silva y Arantes, 2019), extracto de hoja de olivo (Al-Rimawi et al., 2017), extractos de romero y pitanga (Vargas et al., 2016) y extractos de alga parda (Moroney et al., 2013), todos estos extractos presentaron un efecto prooxidante en hamburguesas debido a las propiedades reductoras de los constituyentes del extracto que mantienen el hierro hemo en la forma ferrosa en la reacción de Fenton y por lo tanto, la descomposición de hidrógeno a radicales hidroxilo catalizaría la oxidación lipídica (Paula, 2017), a su empleo en elevadas concentraciones (Nieto et al., 2012; Al-Rimawi et al., 2017; Silva y Arantes, 2019) o su interacción con iones metálicos como el hierro o el cobre, los cuales promueven la oxidación de lípidos en productos cárnicos (Moroney et al., 2013; Vargas et al., 2016; Al-Rimawi et al., 2017).

Por otra parte, se observó que los valores de grupos tiol libres (nmol tiol/mg prot) disminuyeron desde valores de 291,28-303,62 nmol tiol/mg prot hasta 200,53-263,52 nmol tiol/mg prot, aunque no fue una disminución estadísticamente significativa ($P > 0,05$) a lo largo de tiempo de almacenamiento ($P > 0,05$). Como consecuencia de la oxidación proteica los grupos sulfhidrilo forman enlaces disulfuros inter e intramoleculares, por lo que la concentración de los grupos sulfhidrilo disminuye con la evolución ascendente de las reacciones de oxidación (Lund et al., 2011). Otros autores, en sus estudios con hamburguesas tratadas con extractos naturales (extracto de uva blanca, extractos de grosellas negras y extractos de tomate, uva tinta, aceituna y granada) envasadas en atmósferas modificadas y almacenadas bajo condiciones de refrigeración, observaron que durante el tiempo de almacenamiento se produjo la pérdida de grupos sulfhidrilos y por lo tanto, las reacciones de oxidación proteica tenían lugar de forma sustancial (Jongberg, et al., 2011; Jia et al., 2012; Andrés et al., 2017), lo cual no ocurre en el presente trabajo.

Respecto al efecto de la adición de ascorbato sódico o de extractos liofilizados de bagazo en los valores de oxidación proteica este no fue estadísticamente significativo en ninguno de los días de toma de muestras ($P>0,05$). Pateiro et al., (2018) y Zahid et al., (2018) tampoco observaron diferencias significativas en hamburguesas refrigeradas para este parámetro debidas a la adición de extracto de semilla de guaraná y extractos de hilo dorado y clavo, respectivamente. Por el contrario, otros estudios sí que han observado que extractos de romero y de hoja de pitanga roja frenaron mejor la oxidación proteica en hamburguesas que aditivos como el BHT (Lara et al., 2011; Lorenzo et al., 2018)

5.4. Análisis microbiológico

En la TABLA 5.1 se presentan los recuentos obtenidos para Enterobacterias totales, microorganismos Psicrófilos y Bacterias ácido-lácticas.

TABLA 5. 4. Efecto del tiempo de almacenamiento y extracto añadido sobre el recuento microbiano (expresado en \log_{10} ufc/g) de hamburguesas de cerdo frescas envasadas en MAP y almacenadas durante 9 días en refrigeración ($4 \pm 1^\circ\text{C}$).

Día	LOTE	Enterobacterias totales	Psicrófilos	Bacterias ácido-lácticas
0	BSG 1000	3,22±0,08 ³	5,45±0,12 ³	2,55±0,12 ³
	BSG 3000	3,56±0,09 ³	5,67±0,14 ³	2,49±0,07 ³
	CONTROL-	3,45±0,11 ³	5,89±0,09 ³	2,67±0,09 ³
	CONTROL+	3,60±0,10 ³	5,76±0,11 ³	2,34±0,10 ³
	P _{lote}	ns	ns	ns
4	BSG 1000	4,83±0,02d ²	8,02±0,06c ²	6,09±0,01b ²
	BSG 3000	5,24±0,02b ²	8,46±0,04a ²	5,99±0,03b ²
	CONTROL-	5,09±0,04c ²	8,16±0,05b ²	6,13±0,01a ²
	CONTROL+	5,56±0,05a ²	8,44±0,01a ²	5,79±0,02b ²
	P _{lote}	***	***	***
9	BSG 1000	6,33±0,08b ¹	9,09±0,16b ¹	7,46±0,07 ¹
	BSG 3000	6,24±0,06b ¹	9,48±0,01a ¹	7,48±0,04 ¹
	CONTROL-	5,94±0,02c ¹	9,00±0,07b ¹	7,37±0,12 ¹
	CONTROL+	6,66±0,03a ¹	9,41±0,04a ¹	7,50±0,06 ¹
	P _{lote}	***	*	ns

CONTROL- (hamburguesa sin extracto agregado); CONTROL+ (hamburguesa con 1000 mg ácido ascórbico/kg carne); BSG 1000 (hamburguesa con 1000 mg de extracto de bagazo liofilizado por kg de carne); BSG 3000 (hamburguesa con 3000 mg de extracto de bagazo liofilizado por kg de carne).

a-c, los valores con letras diferentes en el mismo día de almacenamiento son significativamente diferentes debido al efecto lote ($p < 0.05$); 1-2-3, los valores con diferentes números en el mismo lote son significativamente diferentes debido al efecto día de almacenamiento ($p < 0.05$). Niveles significativos: ns: no significativo; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

Los recuentos iniciales de Enterobacterias totales y de psicrófilos (microorganismos aerobios totales) fueron de 3,22-3,60 \log_{10} ufc/g y 5,45-5,89 \log_{10} ufc/g respectivamente, los cuales aumentaron de forma estadísticamente significativa después de 4 y 9 días de almacenamiento en condiciones de refrigeración ($P < 0,001$ y $P < 0,05$), hasta valores finales de 5,94-6,66 \log_{10} ufc/g y 9,00-9,48 \log_{10} ufc/g, respectivamente. Estos valores se encuentran dentro de los límites establecidos por el Reglamento (CE) N° 2073/2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, mostrados en la TABLA 2.2. Otros autores como Lorenzo et al. (2013), Zhang et al. (2016) y Andrés et al, (2017) observaron también que los recuentos de Enterobacterias totales y microorganismos psicrófilos aumentaron también durante

todo el almacenamiento bajo condiciones de refrigeración en hamburguesas de cerdo, lomos de cerdo y hamburguesas de cordero, respectivamente, envasadas en atmósferas modificadas. Estos recuentos se deben a distintos factores como la posible contaminación inicial que puede haber en material y equipos, a que en el proceso de picado se aumenta la temperatura de la carne, a la contaminación inicial de las piezas cárnicas utilizadas, etc. todo ello favorecería la proliferación de microorganismos psicrófilos como el desarrollo de Enterobacterias (Ortega-Blázquez, 2014).

En cuanto a la evolución de las bacterias ácido-lácticas, los recuentos aumentaron desde valores iniciales de 2,34-2,67 ufc/g hasta valores finales de 7,37-7,50 ufc/g, durante el periodo de almacenamiento. Las bacterias ácido lácticas forman parte de la flora microbiana natural de las carnes envasadas en atmósferas modificadas (Lorenzo et al., 2014). Los lotes BSG 1000 y BSG 3000 fueron los que menores valores presentaron en el recuento de bacterias ácido lácticas tras 4 y 9 días de almacenamiento. Las bacterias ácido-lácticas son anaerobias, pero no sensibles al O₂, por lo que pueden crecer tanto en presencia como en ausencia del mismo (Liziano, 2013), hasta niveles de 10⁷ ufc/cm² (Zhang y Zhang, 2017). Pueden llegar a considerarse como especies bacterianas alterantes debido a que su actividad metabólica puede provocar acidez, decoloración, producción de gas, pérdida de sabores y olores, exudado lechoso, hinchazón del envase, cambios en el pH, sin tener que afectar a la inocuidad del producto, pero sí a su calidad sensorial (Salgado et al., 2013).

Con respecto al efecto de la adición de extractos, el lote BSG 1000 (1000 mg de extracto de bagazo liofilizado/kg carne) fue el que menores recuentos de Enterobacterias totales y psicrófilos presentó (P<0,001), después de 4 días de almacenamiento en refrigeración. Estos resultados concuerdan con Lorenzo et al. (2013), Zhang et al. (2016) y Andrés et al. (2017), cuyas investigaciones mostraron mejores resultados las hamburguesas tratadas con extractos naturales. Hubo diferencias estadísticamente significativas (P<0,001), tras 4 días de almacenamiento, en el recuento de bacterias ácido-lácticas siendo el CONTROL-, el que mayores valores presentó, condiciendo con Lorenzo et al., (2013) y Zamuz et al., (2018) en sus estudios con extractos de té, uva, castaña y algas aplicados en carne y extractos de cáscara, fresa, y hojas de castaño aplicados en hamburguesas, respectivamente.

Sin embargo, en el día 9 de almacenamiento, el lote CONTROL– obtuvo menores recuentos para Enterobacterias y psicrófilos ($P < 0,001$ y $P < 0,05$, respectivamente), por lo que puede inferirse que el extracto de bagazo liofilizado no presentó capacidad antimicrobiana, coincidiendo con Zamuz et al (2018) en cuya investigación trataron hamburguesas de carne con extracto de castaña. Por el contrario, existen autores que demostraron que extractos naturales de té, uva, *Nitraria retusa*, semilla de guaraná o madera de roble fueron capaz de tener un efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano (Lorenzo et al., 2013; Meriem et al., 2014; Pateiro et al., 2018; Soriano et al., 2018). Como se ha mencionado anteriormente, no existe bibliografía científica concreta sobre la adición de extractos de bagazo en hamburguesas, por lo que no es posible comparar estos resultados.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. Los extractos liofilizados de bagazo extraídos en solución acuosa con Ultrasonidos, presentaron un efecto conservante del color rojo de las hamburguesas en las concentraciones aplicadas en el presente trabajo de investigación, que fue similar o comparable al del ascorbato sódico.
2. La aplicación de los extractos de bagazo liofilizado en hamburguesas de carne de cerdo almacenadas bajo las condiciones establecidas en este estudio, aumentó la estabilidad de lípidos frente a la oxidación, en comparación con el lote al que no se le había añadido ningún tipo de antioxidante. Por tanto, el empleo de estos extractos sería de especial interés en las industrias cárnicas agroalimentarias.
3. La adición de extractos de bagazo liofilizado, en las concentraciones aplicadas, no mostró ningún efecto antimicrobiano destacable durante el almacenamiento de las hamburguesas en refrigeración.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Adams, K. R., Niebuhr, S. E., y Dickson, J. S. (2015). Dissolved carbon dioxide and oxygen concentrations in purge of vacuum-packaged pork chops and the relationship to shelf life and models for estimating microbial populations. *Meat science*, 110, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.06.003>

Albán Cabaco, B., Núñez Tabales, J. M., y Sánchez Cañizares, S. M. (2015). El sector cervecero artesanal español y sus posibilidades de internacionalización. *Regional and Sectoral Economic Studies*, 15(2), 145-156.

Albanese, L., Ciriminna, R., Meneguzzo, F., y Pagliaro, M. (2018). Innovative beerbrewing of typical, old and healthy wheat varieties to boost their spreading. *Journal of cleaner production*, 171, 297-311. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.027>

Al-Rimawi, F., Tarawa, M. S., y Elama, C. (2017). Olive Leaf Extract as Natural Antioxidant Additive of Fresh Hamburger Stored at 4 C Running Title: Antioxidants from Olive Leaves in Hamburger.

AMSA (2011). Guidelines: Instrumental Meat Color Measurement. Section VIII-V8.

Andrés, A. I., Petró, M. J., Adámez, J. D., López, M., y Timón, M. L. (2017). Food by-products as potential antioxidant and antimicrobial additives in chill stored raw lamb patties. *Meat science*, 129, 62-70. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.02.013>

Andrés, A. I., Petron, M. J., Delgado-Adamez, J., Lopez, M., y Timon, M. (2017). Effect of tomato pomace extracts on the shelf-life of modified atmosphere-packaged lamb meat. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(4), e13018. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13018>

Andres, A. I., Petron, M. J., Lopez, A. M., y Timon, M. L. (2020). Optimization of Extraction Conditions to Improve Phenolic Content and In Vitro Antioxidant Activity in Craft Brewers' Spent Grain Using Response Surface Methodology (RSM). *Foods*, 9(10), 1398. <https://doi.org/10.3390/foods9101398>

Armenteros, M., Ventanas, S., Morcuende, D., Estévez, M., y Ventanas, J. (2012). Empleo de antioxidantes naturales en productos cárnicos. *Eurocarne*, 207, 63-73.

B.O.E., 1985. Real Decreto 168/1985, de 6 de febrero, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria sobre “Condiciones Generales de Almacenamiento Frigorífico de Alimentos y Productos Alimentarios”, «BOE» núm. 39, de 14 de febrero de 1985, página 3733.

B.O.E., 2016. Real Decreto 678/2016, de 16 de diciembre, por el que se aprueba la norma de calidad de la cerveza y de las bebidas de malta, «BOE» núm. 304, de 17 de diciembre de 2016, páginas 88520 a 88524

Baltasar, R. S., Parra, M. L., y Nieto, A. I. A. (2019). Optimization of the shelf life of lamb forelegs packed in different multilayer polymeric materials and modified atmospheres. *Journal of food science and technology*, 56(4), 2224-2232.

Banon, S., Díaz, P., Rodríguez, M., Garrido, M. D., y Price, A. (2007). Ascorbate, green tea and grape seed extracts increase the shelf life of low sulphite beef patties. *Meat science*, 77(4), 626-633. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.05.015>

Barber, X. G. (2014). *La cerveza en España: Orígenes e implantación de la industria cervecera*. LID Editorial.

Barbero López, M. (2017). Estudio de la alteración oxidativa del aceite de oliva virgen: compuestos fenólicos.

Batifoulier, F.; Mercier, Y.; Gatellier, P.; y Renner, M. (2002). Influence of vitamin E on lip and protein oxidation induced by H₂O₂-activated MetMb in microsomal membranes from turkey muscle. *Meat Science*, 61: 389-395. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(01\)00209-1](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(01)00209-1)

Berardo, A., De Maere, H., Stavropoulou, D. A., Rysman, T., Leroy, F., y De Smet, S. (2016). Effect of sodium ascorbate and sodium nitrite on protein and lipid oxidation in dry fermented sausages. *Meat Science*, 121, 359-364. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.07.003>

Bolumar, T., LaPeña, D., Skibsted, L. H., y Orlien, V. (2016). Rosemary and oxygen scavenger in active packaging for prevention of high-pressure induced lipid oxidation in pork patties. *Food Packaging and Shelf Life*, 7, 26-33. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.01.002>

Boskovic, M., Djordjevic, J., Ivanovic, J., Janjic, J., Zdravkovic, N., Glisic, M., ... y Baltic, M. (2017). Inhibition of Salmonella by thyme essential oil and its effect on microbiological and sensory properties of minced pork meat packaged under vacuum and modified atmosphere. *International journal of food microbiology*, 258, 58-67. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.011>

Cabanillas, J. I. G. (2016). Efecto de la adición de subproductos derivados del tomate y otras fuentes de antioxidantes durante el cebo de corderos de raza merina sobre la calidad de la canal y de la carne fresca y envasada en atmósferas protectoras (Doctoral dissertation, Universidad de Extremadura).

Cabo de Castro, M.J; Sánchez, C.I; García M.D; Garzón A. y González I. (2009). La capacidad de retención de agua de las carnes de reses de lidia. *Symposium del Toro de lidia*.

Calderón Hurtado, C (2015). Incremento de la vida útil de derivados de carne de cordero utilizando extractos vegetales.

Campion, D. S. (2013). Calidad de la carne porcina según el sistema de producción.

Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., y Ferreira, I. C. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 13(4), 377-399. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12065>

Coma, J., Piquer, J., y Companys, G. V. (1999). Calidad de la carne en porcino efecto de la nutrición. XV Curso de Especialización, *Avances en Nutrición y Alimentación Animal*.

De los Santos Ruete, C. M. (2018). Impacto del uso de antioxidantes naturales sobre la estabilidad del color de los lípidos de hamburguesas de cordero.

De Urbina Criado, M. O., Montes, C. F. F., y Valentín, E. M. M. (2015). Análisis estratégico del sector cervecero español. *Boletín Económico de ICE*, (3062), 53-61.

Decreto 2484/1967, de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español.

Delfanian, M., y Sahari, M. A. (2020). Improving functionality, bioavailability, nutraceutical and sensory attributes of fortified foods using phenolics-loaded nanocarriers as natural ingredients. *Food Research International*, 109555. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109555>

Domínguez, R., Pateiro, M., Gagaoua, M., Barba, F. J., Zhang, W., y Lorenzo, J. M. (2019). A comprehensive review on lipid oxidation in meat and meat products. *Antioxidants*, 8(10), 429.

Durán, L. (2001). Aditivos naturales. *Arbor*, 168(661), 87-107. <https://doi.org/10.3989/arbor.2001.i661.824>

Esmer, O. K., Irkin, R., Degirmencioglu, N., y Degirmencioglu, A. (2011). The effects of modified atmosphere gas composition on microbiological criteria, color and oxidation values of minced beef meat. *Meat science*, 88(2), 221-226. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.12.021>

Fernandez-Lopez, J., Zhi, N., Aleson-Carbonell, L., Pérez-Alvarez, J. A., y Kuri, V. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat science*, 69(3), 371-380. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.08.004>

Franco, D., González, L., Bispo, E., Latorre, A., Moreno, T., Sineiro, J., ... y Núñez, M. J. (2012). Effects of calf diet, antioxidants, packaging type and storage time on beef steak storage. *Meat Science*, 90(4), 871-880. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.10.008>

Gao, Y., Zhuang, H., Yeh, H. Y., Bowker, B., y Zhang, J. (2019). Effect of rosemary extract on microbial growth, pH, color, and lipid oxidation in cold plasma-processed ground chicken patties. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 57, 102168. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.05.007>

García Paz, M. (2017). Los Residuos de cerveza como fuente de antioxidantes naturales (Master's thesis, Universitat Politècnica de Catalunya).

Graciano-Cristóbal, M. J., Sumaya-Martínez, M. T., Balois-Morales, R., Rodríguez-Carpena, J. G., Jiménez-Ruiz, E. I., Bautista-Rosales, P. U., y Madrigal-Santillán, E. O.

(2017). Efecto antimicrobiano de aditivos naturales en carne de cerdo cruda. Rev. Acta Agrícola y Pecuaria, 3(2), 32-40.

Gutiérrez, J. I., Tejada, J. F., Carrapiso, A. I., Petró, M. J., Lara, M. S., y Andrés, A. I. (2011). Shelf life of Merino lamb meat retail packaged under atmospheres of various compositions. International journal of food science & technology, 46(3), 492-499. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02515.x>

Ifesan, B. O. T., Siripongvutikorn, S., Hutadilok-Towatana, N., y Voravuthikunchai, S. P. (2009). Evaluation of the ability of Eleutherine americana crude extract as natural food additive in cooked pork. Journal of food science, 74(7), M352-M357. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01254.x>

Jia, N., Kong, B., Liu, Q., Diao, X., y Xia, X. (2012). Antioxidant activity of black currant (*Ribes nigrum* L.) extract and its inhibitory effect on lipid and protein oxidation of pork patties during chilled storage. Meat Science, 91(4), 533-539. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.03.010>

Jiménez González, N. (2018). Calidad tecnológica y microbiológica de la carne transformada de cordero con antioxidantes vegetales (Bachelor's thesis).

Jongberg, S., Skov, S. H., Tørngren, M. A., Skibsted, L. H., y Lund, M. N. (2011). Effect of white grape extract and modified atmosphere packaging on lipid and protein oxidation in chill stored beef patties. Food Chemistry, 128(2), 276-283. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.015>

Kim, S. J., Min, S. C., Shin, H. J., Lee, Y. J., Cho, A. R., Kim, S. Y., y Han, J. (2013). Evaluation of the antioxidant activities and nutritional properties of ten edible plant extracts and their application to fresh ground beef. Meat Science, 93(3), 715-722. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.11.029>

Lara, M. S., Gutierrez, J. I., Timón, M., y Andrés, A. I. (2011). Evaluation of two natural extracts (*Rosmarinus officinalis* L. and *Melissa officinalis* L.) as antioxidants in cooked pork patties packed in MAP. Meat Science, 88(3), 481-488. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.01.030>

Lawrie, R.A. (1998). Ciencia de la carne. Acriba. Zaragoza.

Libera, J., Latoch, A., y Wójciak, K. M. (2020). Utilization of grape seed extract as a natural antioxidant in the technology of meat products inoculated with a probiotic strain of lab. *Foods*, 9(1), 103. <https://doi.org/10.3390/foods9010103>

Lizano Cruz, I. (2013). Efecto de la aplicación de los aceites esenciales extraídos a partir de las hojas de pimienta de Jamaica (*Pimenta dioica*), hojas de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y orégano (*Oreganum vulgare*) en la preservación de carne de res.

Lorenzo, J. M., Sineiro, J., Amado, I. R., y Franco, D. (2014). Influence of natural extracts on the shelf life of modified atmosphere-packaged pork patties. *Meat Science*, 96(1), 526-534. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.08.007>

Lorenzo, J. M., Vargas, F. C., Strozzi, I., Pateiro, M., Furtado, M. M., Sant'Ana, A. S., ... y do Amaral Sobral, P. J. (2018). Influence of pitanga leaf extracts on lipid and protein oxidation of pork burger during shelf-life. *Food Research International*, 114, 47-54. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.046>

Lorenzo, J. M., y Gómez, M. (2012). Shelf life of fresh foal meat under MAP, overwrap and vacuum packaging conditions. *Meat science*, 92(4), 610-618. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.06.008>

Lund, M. N., Heinonen, M., Baron, C. P., y Estévez, M. (2011). Protein oxidation in muscle foods: A review. *Molecular nutrition & food research*, 55(1), 83-95. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000453>

Mariem, C., Sameh, M., Nadhem, S., Soumaya, Z., Najiba, Z., y Raoudha, E. G. (2014). Antioxidant and antimicrobial properties of the extracts from *Nitraria retusa* fruits and their applications to meat product preservation. *Industrial Crops and Products*, 55, 295-303. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.036>

Martín Mateos, M. J. (2013). Aptitud de distintos sistemas de conservación para la prolongación de la vida útil de carne fresca de cerdo ibérico para el consumo directo y de productos derivados.

Martínez Muñoz, A. (2015). Análisis comparativo de compuestos bioactivos en cerveza artesanal y cerveza industrial (Bachelor's thesis).

- Mateo, J. (2007). Estabilidad del color de la carne fresca. *Nacameh*, 1(1), 67-74.
- Merita, Pascual (2020). Acciones y medios digitales durante la crisis del Covid-19 *Celce Magazine*, 99: 62.
- Monteagudo Silgo, M. (2018). Efecto de la incorporación de conservantes naturales sobre la calidad de la carne picada de vacuno (Bachelor's thesis).
- Moroney, N.C., O'grady, M. N., O'doherty, J. V., y Kerry, J. P. (2013). Effect of a brown seaweed (*Laminaria digitata*) extract containing laminarin and fucoidan on the quality and shelf-life of fresh and cooked minced pork patties. *Meat science*, 94(3), 304-311. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.02.010>
- Munekata, P. E. S., Rocchetti, G., Pateiro, M., Lucini, L., Domínguez, R., y Lorenzo, J. M. (2020). Addition of plant extracts to meat and meat products to extend shelf-life and health-promoting attributes: An overview. *Current Opinion in Food Science*, 31, 81-87. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.03.003>
- Muthukumar, M., Naveena, B. M., Vaithyanathan, S., Sen, A. R., y Sureshkumar, K. (2014). Effect of incorporation of *Moringa oleifera* leaves extract on quality of ground pork patties. *Journal of food science and technology*, 51(11), 3172-3180.
- Nieto, G., Skibsted, L. H., Andersen, M. L., y Ros, G. (2012). Actividad antioxidante y prooxidante del aceite esencial de ajo por resonancia de spin electrónica. In *Anales de Veterinaria de Murcia* (Vol. 28, pp. 23-33). <https://doi.org/10.6018/j/188691>
- Nigam, P. S. (2017). An overview: Recycling of solid barley waste generated as a byproduct in distillery and brewery. *Waste management*, 62, 255-261. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.02.018>.
- Ortega Ruiz, A. L. (2015). Evaluación del efecto antioxidante y antimicrobiano de extractos de hojas de *Agave angustifolia* Haw adicionado en hamburguesas de cerdo.
- Ortega-Blázquez, I. (2014). Análisis microbiológico de alimentos cárnicos.
- Pateiro, M., Vargas, F. C., Chinchá, A. A., Sant'Ana, A. S., Strozzi, I., Rocchetti, G., ... y Lorenzo, J. M. (2018). Guarana seed extracts as a useful strategy to extend the shelf life of pork patties: UHPLC-ESI/QTOF phenolic profile and impact on microbial

inactivation, lipid and protein oxidation and antioxidant capacity. *Food Research International*, 114, 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.047>

Paula, C. M. (2017). Efecto combinado del aceite esencial de orégano y extracto de ajo, en la conservación de hamburguesas de carne vacuna refrigerada.

Pereda, J. A. O. (2016). Envasado de alimentos de origen animal en atmósferas modificadas. *Badajoz Veterinaria*, (5), 14-21.

Pérez-Mateos, M., Gómez Estaca, J., Pintado, T., Cofrades, S., y Otero, L. (2019). Almacenamiento hiperbárico de hamburguesas de cerdo como nuevo método de preservación microbiana.

Ramírez-Rojo, M. I., Vargas-Sánchez, R. D., Torres-Martínez, B. D. M., Torrescano-Urrutia, G. R., Lorenzo, J. M., y Sánchez-Escalante, A. (2019). Inclusion of Ethanol Extract of Mesquite Leaves to Enhance the Oxidative Stability of Pork Patties. *Foods*, 8(12), 631. <https://doi.org/10.3390/foods8120631>

Real Decreto 474/2014, de 13 de junio, por el que se aprueba la norma de calidad de derivados cárnicos.

Reglamento (CE) N° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2008 sobre aditivos alimentarios.

Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

Reglamento (CE) N° 853/2004 del parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal

Rodríguez-Carpena, J. G., Morcuende, D. A. V. I. D., y Estévez, M. A. R. I. O. (2011). Avocado by-products as inhibitors of color deterioration and lipid and protein oxidation in raw porcine patties subjected to chilled storage. *Meat science*, 89(2), 166-173. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.04.013>

Salgado, B., Gómez, G. P., y JH Restrepo Flores, C. E. (2013). Efecto de la cadena de frío sobre el crecimiento de bacterias ácido-lácticas, la calidad fisicoquímica y la

alteración de jamones cocidos lonchados empacados al vacío. *Revista Lasallista de Investigación*, 9(2).

Salueña, B. H., Gamasa, C. S., Rubial, J. M. D., y Odriozola, C. A. (2019). CIELAB color paths during meat shelf life. *Meat science*, 157, 107889. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107889>

Sampaio, G. R., Saldanha, T., Soares, R. A. M., y Torres, E. A. F. S. (2012). Effect of natural antioxidant combinations on lipid oxidation in cooked chicken meat during refrigerated storage. *Food chemistry*, 135(3), 1383-1390. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.103>

Sánchez-Escalante, A., Djenane, D., Torrescano, G., Beltrán, J. A., y Roncalés, P. (2001). The effects of ascorbic acid, taurine, carnosine and rosemary powder on colour and lipid stability of beef patties packaged in modified atmosphere. *Meat Science*, 58(4), 421-429. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(01\)00045-6](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(01)00045-6)

Santos-Fandila, A., Camino-Sánchez, F., y Zafra-Gómez, A. (2014). Degradation markers in nutritional products a review. *Austin Journal of Analytical Pharmaceutical Chemistry*, 1(1), 1005.

Selani, M. M., Contreras-Castillo, C. J., Shirahigue, L. D., Gallo, C. R., Plata-Oviedo, M., y Montes-Villanueva, N. D. (2011). Wine industry residues extracts as natural antioxidants in raw and cooked chicken meat during frozen storage. *Meat science*, 88(3), 397-403. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.01.017>

Shan, L. C., De Brún, A., Henchion, M., Li, C., Murrin, C., Wall, P. G., y Monahan, F. J. (2017). Consumer evaluations of processed meat products reformulated to be healthier—A conjoint analysis study. *Meat science*, 131, 82-89. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.04.239>

Shan, L. C., Regan, Á., Monahan, F. J., Li, C., Lalor, F., Murrin, C., ... y McConnon, Á. (2017). Consumer preferences towards healthier reformulation of a range of processed meat products. *British Food Journal*. <https://doi.org/10.1108/BFJ-11-2016-0557>

Silva, L., y Arantes, E. (2019). Efecto del aceite esencial y extracto acuoso del poleo (*Mintostachys mollis*) en la estabilidad oxidativa de carne de cuy empacado al vacío.

Šojić, B., Tomović, V., Kocić-Tanackov, S., Kovačević, D. B., Putnik, P., Mrkonjić, Ž., ... y Pavlić, B. (2020). Supercritical extracts of wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) by-product as natural antioxidants in ground pork patties. *LWT*, 130, 109661. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109661>

Sorensen, G., y Jorgensen, S. S. (1996). A critical examination of some experimental variables in the 2-thiobarbituric acid (TBA) test for lipid oxidation in meat products. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 202(3), 205-210.

Soriano, A., Alañón, M. E., Alarcón, M., García-Ruíz, A., Díaz-Maroto, M. C., y Pérez-Coello, M. S. (2018). Oak wood extracts as natural antioxidants to increase shelf life of raw pork patties in modified atmosphere packaging. *Food Research International*, 111, 524-533. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.055>

Varela, D. (2021). ¿Cuáles son las tendencias del sector cervecero español en 2021? *Celce Magazine*, 102: 68

Vargas, F. C., Arantes-Pereira, L., Costa, P. A. D., Melo, M. P. D., y Sobral, P. J. D. A. (2016). Rosemary and pitanga aqueous leaf extracts on beef patties stability under cold storage. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59.

Vega, F. A. (2004). Aditivos alimentarios: usos y abusos. *La transformación industrial de la producción agropecuaria*, 89-116.

Venegas, O., y Pérez, D. (2018). Determinación de rancidez en carne. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 19(1).

Villalobos-Delgado, L. H., Caro, I., Blanco, C., Bodas, R., Andrés, S., Giráldez, F. J., y Mateo, J. (2015). Effect of the addition of hop (infusion or powder) on the oxidative stability of lean lamb patties during storage. *Small Ruminant Research*, 125, 73-80. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.02.008>

Zahid, M. A., Seo, J. K., Park, J. Y., Jeong, J. Y., Jin, S. K., Park, T. S., y Yang, H. S. (2018). The effects of natural antioxidants on protein oxidation, lipid oxidation, color, and sensory attributes of beef patties during cold storage at 4°C. *Korean journal for food science of animal resources*, 38(5), 1029.

Zakrys-Waliwander, P.I.; O'Sullivan, M.G.; O'Neill, E.E. y Kerry, J.P. (2012). The effects of high oxygen modified atmosphere packaging on protein oxidation of bovine *M. longissimus dorsi* muscle during chilled storage. *Food Chemistry*, 131-532.

Zamuz, S., López-Pedrouso, M., Barba, F. J., Lorenzo, J. M., Domínguez, H., y Franco, D. (2018). Application of hull, bur and leaf chestnut extracts on the shelf-life of beef patties stored under MAP: Evaluation of their impact on physicochemical properties, lipid oxidation, antioxidant, and antimicrobial potential. *Food Research International*, 112, 263-273. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.053>

Zhang, J., Wang, Y., Pan, D. D., Cao, J. X., Shao, X. F., Chen, Y. J., ... y Ou, C. R. (2016). Effect of black pepper essential oil on the quality of fresh pork during storage. *Meat science*, 117, 130-136. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.03.002>

Zhang, W., y Zhang, Y. (2017). 5 Spoilage Microorganisms in Meat Products. *Food Spoilage Microorganisms: Ecology and Control*.

Zhang, Y. Y., Zhang, F., Thakur, K., Ci, A. T., Wang, H., Zhang, J. G., y Wei, Z. J. (2018). Effect of natural polyphenol on the oxidative stability of pecan oil. *Food and chemical toxicology*, 119, 489-495. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.10.001>

8. WEBGRAFÍA

8. WEBGRAFÍA

Agrodigital (2017). El 94% de las más de 19000 fábricas de cerveza son artesanales, según un nuevo estudio de The Brewers Journal y Alltech. Disponible en: <https://www.agrodigital.com/2017/04/06/el-94-de-las-mas-de-19-000-fabricas-de-cerveza-son-artesanales-segun-un-nuevo-estudio-de-the-brewers-journal-y-alltech/>

Cervecing (2021). Albercht V Bayern. Disponible en: https://cervecing.es/historia-la-cerveza/albrecht_v_bayern/

Cervecistas (2020). Historia de la cerveza. Disponible en: <https://www.loscervecistas.es/historia-de-la-cerveza/>

Extremadura21 (2016). Economía, agricultura, alimentos de calidad, turismo. Atlas de la cerveza artesana en Extremadura. Disponible en: <https://extremadura21.com/2016/12/07/atlas-de-la-cerveza-artesana-en-extremadura/>

La Vanguardia (2020). El negocio de las cervezas se resiente por el cierre de la hostelería. Disponible en: <https://www.lavanguardia.com/economia/20200427/48740910842/cerveza-consumo-coronavirus-covid-espana-espana.html>

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2021). Informe del consumo alimentario en España 2020. Disponible en: <https://mapa.gob.es>

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2021). Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor. Producción y Sanidad Animal. Calidad de la carne. Disponible en: <http://www.fao.org>

Reconnect Beer (2020). Covid-19 Impact. Beer & Hospitality. Disponible en: <https://reconnect.beer/beer-and-hospitality/>

The Brewers of Europe (2019). Country profiles. Disponible en: <https://brewersofeurope.org/>

