

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL**



**EFFECTO DE CULTIVOS INICIADORES EN LA  
PROTEÓLISIS Y VIDA ÚTIL EN SALCHICHAS  
FERMENTADAS**

**TESIS**

PRESENTADA POR:

**Bach. DEYSI YOLANDA MAMANI ROBLES**

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE:

**INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

**PUNO – PERÚ**

**2013**

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

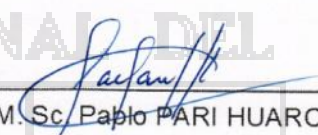
**EFECTO DE CULTIVOS INICIADORES EN LA PROTEÓLISIS Y  
VIDA ÚTIL EN SALCHICHAS FERMENTADAS**

PRESENTADA POR:


**Bach. DEYSI YOLANDA MAMANI ROBLES**

PARA OPTAR EL TITULO DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL  
APROBADO POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:

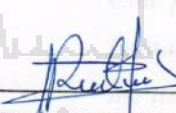
PRESIDENTE

  
Ing. M. Sc. Pablo PARI HUARCAYA

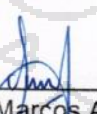
PRIMER MIEMBRO

  
Ing. M. Sc. Roger SEGURA PEÑA

SEGUNDO MIEMBRO

  
Ing. Rosario Edely ORTEGA BARRIGA

DIRECTOR DE TESIS

  
Ph. D. Juan Marcos ARO ARO

ASESOR DE TESIS

  
Ing. Edgar GALLEGOS ROJAS

**Área: Ingeniería y tecnología**

**Tema: Desarrollo de procesos y productos agroindustriales sostenibles y eficientes**

## DEDICATORIA

*Primeramente, a Dios que me dio  
la oportunidad de vivir y darme  
la fuerza necesaria para salir  
adelante en cada tropiezo.*

*Con amor a mis padres;  
Sabino Mamani y Elena Robles  
que me dieron la vida, por  
estar conmigo en todo momento  
apoyándome y brindándome su cariño.*

*Con mucho cariño a mis hermanas;  
Erika, Yaneth y a mi abuelita  
Silveria quienes siempre estuvieron  
conmigo en los momentos importantes  
de mi vida personal y profesional.*

*Con profundo amor a mi tío  
Fernando que desde el cielo me  
ilumina y acompaña todos mis días.*

## AGRADECIMIENTO

- *Quiero dar las gracias a Dios, por todas y cada una de las personas que puso en mi camino, que hicieron posible la realización de este trabajo.*
- *A la Universidad Nacional del Altiplano – Puno, a la escuela profesional de Ingeniería Agroindustrial que me dio la oportunidad de formarme como profesional.*
- *Asimismo, a mi director de tesis Ph. D. Juan Marcos Aro Aro, que con su empeño y dedicación compartió sus conocimientos y la labor de dirección desempeñada en este trabajo de investigación.*
- *Al Ing. Edgar Gallegos Rojas por su asesoramiento durante la ejecución.*
- *Quisiera agradecer al Ing. M.Sc. Florentino Víctor Choquehuanca Cáceres y a la Ing. Marianela por su apoyo desmedido y orientación en la realización de los análisis microbiológicos durante la ejecución de esta tesis.*
- *Al panel de catadores; Nieves, Margarita, Mirian, Dina, Mónica, Fredy, Faustino y Rubén.*
- *A todo el personal de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial por su ayuda y colaboración en el desarrollo de este trabajo.*
- *A la empresa Chr. Hansen de Perú, Argentina y México por brindarme su confianza y facilitarme los cultivos iniciadores para el desarrollo del trabajo.*
- *A mis padres y hermanas por su incondicional apoyo y cariño entregada durante toda mi vida.*
- *A mis queridos amigos(as) Mirian, Anali, Rubén, Eddy, Edwin, Jesús y Vidman, por brindarme su apoyo durante esta andadura que han estado ahí para lo que necesite.*

## ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE GENERAL	
LISTA DE TABLAS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE ANEXOS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. EMBUTIDOS FERMENTADOS	3
2.2. CLASIFICACIÓN DE LOS EMBUTIDOS	3
2.3. PROCESO DE PRODUCCIÓN DE LOS EMBUTIDOS	5
2.3.1. Componentes de los embutidos	5
2.3.1.1. Carne	5
2.3.1.2. Grasa	6
2.3.1.3. Sal común	6
2.3.1.4. Sales de cura	7
2.3.1.5. Azúcar	8
2.3.1.6. Tripa	8
2.3.2. Elaboración del embutido	9
2.3.2.1. Picado y mezclado de los ingredientes	11
2.3.2.2. Fermentación	11
2.3.2.3. Maduración	12
2.4. CAMBIOS BIOQUÍMICOS DURANTE LA MADURACIÓN DE LOS EMBUTIDOS FERMENTADOS	14
2.4.1. Modificaciones físicas	14

2.4.1.1.	Cambios en el pH	14
2.4.1.2.	Cambios en la actividad de agua ( $a_w$ )	17
2.4.2.	Modificaciones bioquímicas	18
2.4.2.1.	Cambios en los hidratos de carbono	18
2.4.2.2.	Cambios en las proteínas y proteólisis	19
2.5.	MICROBIOLOGIA DE LOS EMBUTIDOS Y USO DE CULTIVOS INICIADORES	24
2.5.1.	Cultivos iniciadores	25
2.5.2.	Microorganismos que componen los cultivos iniciadores	26
2.5.2.1.	Bacterias ácido lácticas	27
2.5.2.2.	Micrococaceas	28
2.6.	CARACTERÍSTICA SENSORIAL DE LOS EMBUTIDOS	30
2.7.	TÉCNICA ANALÍTICA EMPLEADA	31
2.7.1.	Electroforesis SDS-PAGE	31
2.8.	VIDA ÚTIL DE PRODUCTOS CÁRNICOS	32
2.8.1.	Principales factores de deterioro	33
2.8.2.	Determinación de la cinética de deterioro	34
2.8.2.1.	Reacción de orden cero	35
2.8.3.	Variables que determinan la vida útil de los embutidos	36
2.8.3.1.	Pérdida de peso	36
2.8.3.2.	Calidad microbiológica	37
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	40
3.1.	LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO	40
3.2.	MATERIAL EXPERIMENTAL	40
3.3.	MATERIAL GENERAL DE LABORATORIO	42
3.3.1.	Instrumentos de laboratorio	42
3.3.2.	Equipos	42

3.3.3. Reactivos	43
3.3.4. Medios de cultivo	44
3.4. MÉTODOS	45
3.4.1. Metodología experimental	45
3.4.2. Elaboración de las salchichas	47
3.4.3. Factores en estudio	50
3.4.4. Variables de respuesta	51
3.4.5. Método para el análisis físico	51
3.4.5.1. Determinación de pH	51
3.4.5.2. Determinación de actividad de agua ( $a_w$ )	52
3.4.6. Método para análisis microbiológico	52
3.4.6.1. Preparación de las muestras	52
3.4.6.2. Preparación de los medios de cultivo	53
3.4.6.3. Enumeración de la flora láctica (BAL)	54
3.4.6.4. Enumeración de las bacterias viables totales	54
3.4.6.5. Enumeración de coliformes totales	55
3.4.7. Evaluación de los atributos sensoriales	55
3.4.8. Método para análisis de electroforesis (SDS-PAGE)	56
3.4.9. Método para el estudio de vida útil	56
3.4.9.1. Control de mermas de pesos	56
3.4.9.2. Pruebas microbiológicas	57
3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL	58
3.5.1. Evolución de actividad de agua ( $a_w$ ), pH, y microbiológica de las salchichas.	58
3.5.2. Característica sensorial de las salchichas	59
3.5.3. Determinación de la vida útil de las salchichas	60

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	61
4.1. PARAMETROS FÍSICOS	61
4.1.1. Evolución del pH	61
4.1.2. Evolución de actividad de agua ( $a_w$ )	64
4.2. EVOLUCIÓN DE LOS RECUENTOS MICROBIOLÓGICOS	66
4.2.1. Flora láctica	66
4.2.2. Bacterias viables totales	70
4.2.3. Coliformes totales	74
4.3. EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES	75
4.3.1. Aceptabilidad	75
4.3.2. Color	77
4.3.3. Olor	79
4.3.4. Sabor	80
4.3.5. Textura	83
4.4. PROTEÓLISIS DE LAS PROTEÍNAS SARCOPLASMICAS Y MIOFIBRILARES	84
4.4.1. Proteólisis de las proteínas sarcoplasmicas	85
4.4.2. Proteólisis de las proteínas miofibrilares	87
4.5. VIDA ÚTIL DE LAS SALCHICHAS	89
4.5.1. Evolución microbiológica	90
4.5.2. Pérdida de peso	91
4.5.3. Cálculo de vida útil	92
V. CONCLUSIONES	96
VI. RECOMENDACIONES	97
VII. BIBLIOGRAFÍA	98
ANEXOS	07



## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Clasificación de embutidos fermentados	4
Tabla 2. Tipos de embutidos fermentados	5
Tabla 3. Sabores de los componentes resultantes de la actuación enzimática	22
Tabla 4. Microorganismos usados como cultivos iniciadores para embutidos crudos curados	27
Tabla 5. Esquema del experimento	46
Tabla 6. Ingredientes para la fabricación de las salchichas	47
Tabla 7. Valores medios (log ufc/ml muestra) y desviación estándar de los recuentos de coliformes totales.	74
Tabla 8. Valores medios y desviación estándar de los recuentos de bacterias <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> (ufc/ml muestra).	90
Tabla 9. Promedios de pérdida peso durante el tiempo de almacenamiento a diferentes temperaturas	92
Tabla 10. Estimación de la vida útil de las salchichas (almacenadas a distintas temperaturas)	94

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Diagrama de flujo de elaboración de embutido	10
Figura 2. Equipo electroforético	31
Figura 3. Diagrama de flujo de elaboración de salchichas	48
Figura 4. Evolución del pH en las salchichas fermentadas analizadas durante la maduración	62
Figura 5. Evolución de $a_w$ en las salchichas fermentadas analizadas durante la maduración	65
Figura 6. Evolución del recuento de bacterias ácido lácticas en las salchichas fermentadas analizadas durante la maduración	68
Figura 7. Evolución del recuento de bacterias viables totales en las salchichas fermentadas analizadas durante la maduración.	72
Figura 8. Promedio de las puntuaciones medias de las salchichas atributo: aceptabilidad	76
Figura 09. Promedio de las puntuaciones medias de las salchichas atributo: color	78
Figura 10. Promedio de las puntuaciones medias de las salchichas atributo: olor	79
Figura 11. Promedio de las puntuaciones medias de las salchichas atributo: sabor	81
Figura 12. Promedio de las puntuaciones medias de las salchichas atributo: textura	83
Figura 13. Perfil de SDS-PAGE de proteínas sarcoplasmicas durante el procesamiento de salchichas fermentadas.	86
Figura 14. Perfil de SDS-PAGE de proteínas miofibrilares durante el procesamiento de salchichas fermentadas	88

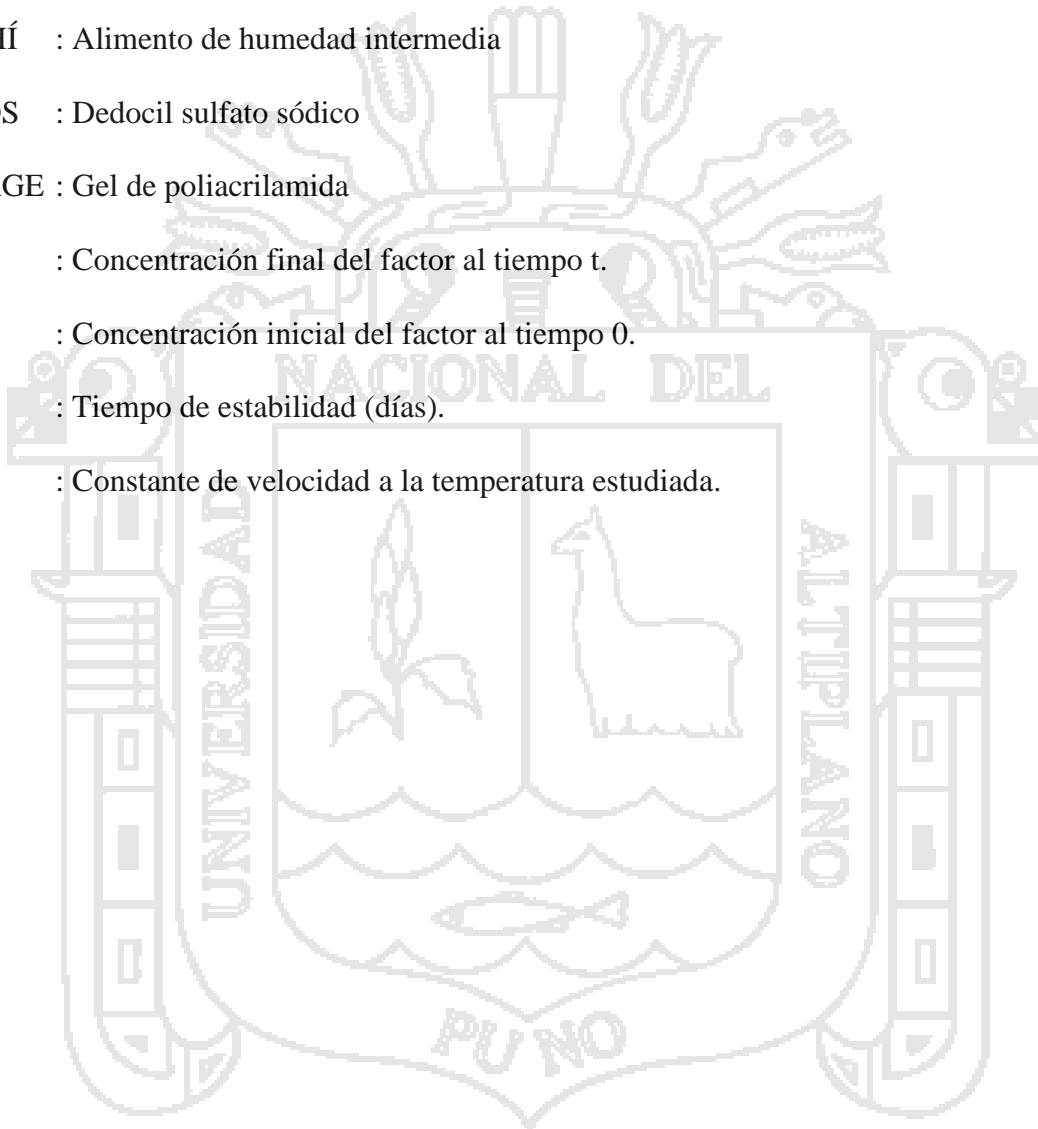
## ÍNDICE DE ANEXOS

		<b>Pág.</b>
Anexo I	Formulario de aceptación del producto	108
Anexo II	Ficha de evaluación organoléptica	109
Anexo III	Métodos electroforéticos para la caracterización de los perfiles polipeptídicos	110
Anexo IV	Valores de pH (media $\pm$ desviación estándar)	113
Anexo V	Valores de $a_w$ (media $\pm$ desviación estándar)	113
Anexo VI	Valores medios (log ufc/ml muestra) y desviación estándar de los recuentos de bacterias ácido lácticas	114
Anexo VII	Valores medios (log ufc/ml muestra) y desviación estándar de los recuentos de bacteria viables totales	114
Anexo VIII	Calificaciones sensoriales (media $\pm$ desviación estándar).	115
Anexo IX	ANOVA para pH a los 0 días	115
Anexo X	ANOVA para pH a los 3 días	115
Anexo XI	ANOVA para pH a los 6 días	116
Anexo XII	ANOVA para pH a los 12 días	116
Anexo XIII	ANOVA para pH a los 21 días	117
Anexo XIV	ANOVA para $a_w$ a los 0 días	117
Anexo XV	ANOVA para $a_w$ a los 3 días	117
Anexo XVI	ANOVA para $a_w$ a los 6 días	118
Anexo XVII	ANOVA para $a_w$ a los 12 días	118
Anexo XVIII	ANOVA para $a_w$ a los 21 días	119
Anexo XIX	ANOVA para BAL a los 0 días	119

Anexo XX	ANOVA para BAL a los 3 días	119
Anexo XXI	ANOVA para BAL a los 6 días	120
Anexo XXII	ANOVA para BAL a los 12 días	120
Anexo XXIII	ANOVA para BAL a los 21 días	121
Anexo XXIV	ANOVA para bacterias viables totales a los 0 días	121
Anexo XXV	ANOVA para bacterias viables totales a los 3 días	122
Anexo XXVI	ANOVA para bacterias viables totales a los 6 días	122
Anexo XXVII	ANOVA para bacterias viables totales a los 12 días	122
Anexo XXVIII	ANOVA para bacterias viables totales a los 21 días	122
Anexo XXIX	ANOVA para coliformes a los 0 días	123
Anexo XXX	ANOVA para coliformes a los 3 días	123
Anexo XXXI	ANOVA para aceptabilidad de las salchichas	123
Anexo XXXII	ANOVA para atributo color	123
Anexo XXXIII	ANOVA para atributo olor	124
Anexo XXXIV	ANOVA para atributo sabor.	124
Anexo XXXV	ANOVA para atributo textura.	125
Anexo XXXVI	Figura 15 evolución del porcentaje de pérdida de peso almacenada a 15 °C	125
Anexo XXXVII	Panel fotográfico	126

## LISTA DE ABREVIATURAS

- BAL : Bacteria ácido lácticas
- $a_w$  : Actividad de agua
- Sc : *Staphylococcus carnosus*
- Ls : *Lactobacillus sakei*
- AHÍ : Alimento de humedad intermedia
- SDS : Dedocil sulfato sódico
- PAGE : Gel de poliacrilamida
- $Q_f$  : Concentración final del factor al tiempo t.
- $Q_0$  : Concentración inicial del factor al tiempo 0.
- t : Tiempo de estabilidad (días).
- K : Constante de velocidad a la temperatura estudiada.



## RESUMEN

En la presente investigación se realizó un estudio sobre el efecto de cultivos iniciadores en la proteólisis y vida útil en salchichas fermentadas. Para ello se elaboraron cuatro tratamientos de salchichas de 36 piezas cada uno, los cuales fueron aplicadas con tres tipos de cultivos iniciadores: *L. sakei*, *S. carnosus* y *L. sakei* + *S. carnosus* más un tratamiento control sin cultivo iniciador. Se sometieron a un proceso de fermentación y maduración. Se estudiaron los cambios en los parámetros físicos (pH y  $a_w$ ), la evolución microbiana, (BAL, bacterias viables totales y coliformes totales). También se estudiaron el efecto de cultivos iniciadores en la proteólisis de las proteínas sarcoplasmicas y miofibrilares. Se realizó una evaluación sensorial y un estudio de vida útil. Los resultados indicaron que en las salchichas aplicadas con *L. sakei* + *S. carnosus* produjeron un descenso de pH más acusado durante la etapa de fermentación y maduración seguido por las salchichas aplicadas con *L. sakei* en cambio los demás tratamientos mostraron una caída lenta, la actividad de agua fue descendiendo paulatinamente a lo largo de todo el proceso, no se aprecian diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). En cuanto a los parámetros microbiológicos, las salchichas aplicadas con cultivos iniciadores mostraron recuentos de BAL significativamente más elevadas ( $p < 0,05$ ) que el tratamiento control, asimismo estos tratamientos mostraron los menores recuentos de bacterias viables totales y coliformes totales. Con relación a la proteólisis, mostraron que *L. sakei*, *S. carnosus* no presenta actividad proteolítica evidente sobre las moléculas de las proteínas miofibrilares, mientras que en las proteínas sarcoplasmicas mostraron un ligero cambio en todos los tratamientos. Con respecto a las características sensoriales, las salchichas aplicadas con *L. sakei* + *S. carnosus* alcanzó la mayor aceptación en todos los atributos analizados, también provee al producto la vida útil más prolongada de 152 días a 15°C, 114 días a 20°C y 101 días a 25°C dándole una ventaja frente a otros embutidos tipo chorizo.

## I. INTRODUCCIÓN

El método de elaboración de los productos cárnicos fermentados, se remonta muchos siglos atrás cuando se estudiaban métodos para prolongar y conservar de mejor manera los alimentos, especialmente la carne. Es así que la elaboración de embutidos busca la conservación de la carne a través de ciertos procesos de transformación que se dan a lo largo de la elaboración de estos productos, en los cuales están implicados parámetros de temperatura, humedad relativa y tiempo; también actúan una serie de microorganismos beneficiosos que ayudan a la obtención de un producto de calidad.

Originalmente los embutidos madurados fueron elaborados sin adición de cultivos iniciadores. Hoy en día, se agregan cultivos iniciadores para mejorar la consistencia y control de la maduración. Entre los principales microorganismos utilizados como cultivos iniciadores se encuentran las *bacterias ácido láctico* y las *micrococaceas*. La presencia de estas bacterias hace que durante el proceso de maduración se produzca ácido láctico y otras sustancias, que impiden el desarrollo de microorganismos patógenos, los que de estar presentes en el producto causarían serios daños a la salud de los consumidores. Así pues, la aplicación de microorganismos seleccionados y caracterizados, (cultivos iniciadores o “starters cultures”), a la masa cárnica, constituye una alternativa para controlar y dirigir tales transformaciones y por consiguiente las características finales del embutido.

Los embutidos fermentados se caracterizan por su bajo valor de humedad, descenso de pH y de actividad de agua en un rango de 0,82 a 0,86 y por la presencia de ácido láctico en concentraciones que le confieren al producto un sabor característico y da lugar a un producto de elevada calidad con larga vida útil y estable microbiológicamente en un ambiente a temperatura de 15 ~16 °C y humedad relativa de 75 ~ 80 %. Una de las transformaciones con mayor impacto en la percepción sensorial, es la hidrólisis de las

proteínas que ocurre durante el proceso de curado de embutidos fermentados. Los objetivos de presente investigación fueron:

### **Objetivo general**

- Evaluar el efecto de los cultivos iniciadores (*Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus carnosus* y *Lactobacillus sakei* + *Staphylococcus carnosus*) en las características físico-químicas, microbiológicas y vida útil de las salchichas fermentadas maduradas.

### **Objetivo específico**

- Elaborar las salchichas fermentadas aplicadas con *Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus carnosus* y *Lactobacillus sakei* + *Staphylococcus carnosus* y evaluar el efecto en las características físicas (pH,  $a_w$ ) y microbiológicos.
- Evaluar el efecto de los cultivos iniciadores en los factores que determinan la calidad sensorial de las salchichas fermentadas
- Conocer el grado de degradación proteica que ocasiona los cultivos iniciadores elegidas (*Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus carnosus* y *Lactobacillus sakei* + *Staphylococcus carnosus*) en las salchichas fermentadas.
- Determinar el tiempo de vida útil de las salchichas fermentadas aplicadas con *Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus carnosus* y *Lactobacillus sakei* + *Staphylococcus carnosus* mediante análisis microbiológico y físico.



## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. EMBUTIDOS FERMENTADOS

Las salchichas constituyen uno de los embutidos más populares y son reconocidas como una de las formas más antiguas de procesar alimentos. Para su elaboración sea empleado con mayor frecuencia la carne de res junto a la de cerdo, alcanzando elevados niveles de consumo (Tinedo, 1998).

Los embutidos son productos cárnicos, que se obtiene de la mezcla de carne molida, grasa, sal, agentes de curado, azúcar, especias y otros aditivos, que se introducen en tripas naturales o artificiales y son sometidos a un proceso de curado, ahumado o cocción (Barco, 2008).

Los embutidos fermentados o madurados se caracterizan por su sabor fuerte y picante, y en muchos casos, por su textura blanda. Estos sabores característicos se producen como consecuencia de la fermentación bacteriana, que da lugar al ácido láctico y otros compuestos (Varnam y Sutherland, 1998).

### 2.2. CLASIFICACIÓN DE LOS EMBUTIDOS

Los embutidos madurados se pueden clasificar basándose en diversos criterios, como la acidez, el tamaño de picado de los ingredientes, adición o no de cultivos iniciadores, presencia de mohos superficiales, adición de unos u otros ingredientes, especias y condimentos, etc. todos estos factores, aparentemente arbitrarios, influyen decisivamente en las características generales de los productos, por lo que serían parámetros de clasificación válidos, ya que implican diversas tecnologías de fabricación (Díaz, 1994b).

Por ejemplo, con arreglo a su acidez se han clasificado en:

- 1) **Productos cárnicos fermentados de baja acidez:** Son productos de maduración larga, con un pH relativamente elevado, generalmente superior a 5,5. Dentro de esta categoría se incluyen todos los tipos de salami.
- 2) **Productos cárnicos fermentados de elevada acidez:** son productos a los que se les añaden carbohidratos, consiguiéndose un pH final menor de 5,3. Estos embutidos se fabrican tanto en Europa como en Estados Unidos, con la diferencia que los primeros se someten a fermentación a baja temperatura (20 ~ 24°C), mientras que en los segundos se utilizan temperaturas elevadas (37°C aproximadamente).

**Tabla 1.** Clasificación de embutidos fermentados.

Tipo de producto	Período de fermentación (días)	Contenido final de agua (%)	Valor final de ( $a_w$ )
Spreadable (untable)	3 ~ 5	34 ~ 42	0.95 ~ 0.96
Sliceable (loncheable)			
Maduración corta	7 ~ 28	30 ~ 40	0.92 ~ 0.94
Maduración larga	80 ~ 90	20 ~ 30	0.85 ~ 0.86

**Fuente:** (Roca y Incze, 1990).

La clasificación de embutidos que se muestra en la tabla 1, considera el tiempo de fermentación y maduración como un criterio básico y establece dos tipos dentro de los embutidos crudos curados: de maduración corta con un contenido final de agua en torno al 30 ~ 40 % y de maduración larga, con un contenido final de agua del 20~30 %. En este último grupo incluye al chorizo y salchichones españoles (Roca y Incze, 1990).

En la tabla 2, se propone un sistema de clasificación, también basado en la pérdida de agua del producto pero además introduce un nuevo criterio: la proporción agua/proteína; que es un término más exacto puesto que relaciona la pérdida de agua con el contenido proteico muy variable en este tipo de productos (Zeuthen, 1995).

**Tabla 2.** Tipos de embutidos fermentados

Tipo	Pérdida de peso (%)	Contenido de agua (%)	Relación agua/proteína
Seco	25 ~ 50	25 ~ 45	2, 3 :1
Semiseco	30	50	2,3 ~ 3,7 :1
No desecados (untables)	10		

**Fuente:** (Zeuthen, 1995).

### 2.3. PROCESO DE PRODUCCIÓN DE EMBUTIDOS

#### 2.3.1. Componentes de los embutidos

##### 2.3.1.1. Carne

La carne se define como todo aquel tejido animal que puede consumirse como alimento. Sin embargo cuando se hace mención a carne, generalmente se hace referencia al tejido muscular de animales que han sido sacrificados y en los que ha tenido lugar el rigor mortis (Ranken, 2003).

La carne es una fuente importante en la dieta humana donde la composición de proteínas, lípidos y carbohidratos varía considerablemente dependiendo de la especie animal, la edad, el sexo, el tipo de alimentación y en condiciones ambientales. La carne que se utiliza normalmente para la

elaboración de estos productos es de cerdo, ternera y/o pollo (López *et al.*, 2001).

### **2.3.1.2. Grasa**

La grasa aporta a los embutidos características importantes en el desarrollo de la calidad sensorial (jugosidad, untuosidad, suavidad, aroma y sabor); sin embargo, esta debe agregarse lo más fresca posible, debido a la susceptibilidad que tiene para oxidarse, causando enranciamiento de los lípidos (Roncales, 1994 y Mira, 1998).

### **2.3.1.3. Sal común**

La sal además de ser un ingrediente que mejora el sabor, proporciona cierto efecto antimicrobiano al provocar un descenso inmediato de la actividad de agua ( $a_w = 0.96$ ) que restringe las condiciones de desarrollo de algunos microorganismos indeseables. Desde el punto de vista tecnológico ejerce un papel primordial en la ligazón de la pasta ya que favorece la solubilidad de las proteínas miofibrilares del músculo, y con ello el desarrollo de la textura (Lucke, 1994).

También hay que tener en cuenta que no todos los productos cárnicos contienen los mismos niveles de sal e incluso dentro de un mismo producto puede variar considerablemente su contenido en sal. Así, en productos cocidos y en embutidos cárnicos fermentados, como el salchichón, podemos encontrar porcentajes de sal del orden 2 ~3 %, en bacón del 3~4 %, mientras que en jamón curado el porcentaje de sal se sitúa entorno al 5~ 8 % (Ruusunen y Puolanne, 2005).

#### 2.3.1.4. Sales de cura

El compuesto activo de las sales de curación es el nitrito (añadido directamente o proveniente de la reducción de nitrato) actúa como agente antimicrobiano, inhibiendo la formación y el crecimiento de *Clostridium botulinum*, contribuye a la formación del color característico del curado (por formación del complejo nitrosomioglobina) y previene la oxidación de los componentes lipídicos al igual que el ascorbato. Las cantidades legalmente autorizadas en España son de 150 ppm para el nitrito y 330 ppm para el nitrato (Real Decreto 142/2002, BOE 20/2/2002)

Otro efecto beneficioso de las sales del curado es su acción conservadora, el nitrato como tal no posee ningún efecto inhibitor sobre los microorganismos, sin embargo el nitrito posee una marcada acción bacteriocida sobre el crecimiento de determinados microorganismos sensibles como *salmonella*. Por sí sola, no inhibe el crecimiento de *Salmonella spp.*, *Clostridium botulinum* ni *Staphylococcus aureus*, aunque si es efectiva cuando se combina con otros factores como valores reducidos de  $a_w$  y pH (Lucke, 1998).

#### 2.3.1.5. Azúcar

Los azúcares constituyen otro ingrediente básico en la elaboración de embutidos crudos curados, se adiciona con el objeto de conseguir una fermentación, son el principal sustrato para el crecimiento microbiano (BAL), generan ácido láctico con el subsiguiente descenso de pH. Con ello logran la inhibición del crecimiento de bacterias alterantes y crean condiciones para la generación de un sabor y firmeza adecuada. Los

azúcares más utilizados en la elaboración de productos crudos curados son: glucosa, fructosa, sacarosa y lactosa, la glucosa fermenta muy rápidamente, la sacarosa más lento y aún más despacio la lactosa (Mata, 1999).

La cantidad y el tipo de azúcar añadido dependen del tipo de producto curado a elaborar, está comprobado que la adición de un 0,1% de azúcar a la masa cárnica provoca un descenso en torno a 0,1 unidades de pH (Prandl *et al.*, 1994).

#### **2.3.1.6. Tripa**

Se llama tripa a un envoltorio cilíndrico que permite dar forma y protección a ciertos productos de charcutería crudos, cocidos, o que hayan sufrido un secado – maduración (Salazar, 2008).

##### **Tripas naturales o animales:**

Las tripas naturales son aquellas que se obtienen de las vísceras de los animales de abasto, estas vísceras pueden ser el intestino y vejiga del cerdo o de la res. Este tipo de tripas antes de su uso deben ser escrupulosamente limpiadas y secadas ya que pueden ser vehículo de contaminación microbiana. (Mira, 1998 y Salazar, 2008).

**Tripas artificiales:**

- Tripas de colágeno: Son una alternativa lógica a las tripas naturales ya que están fabricadas con el mismo compuesto químico.
- Tripas de celulosa: se emplean principalmente en salchichas y productos similares que se comercializan sin tripas.
- Tripas de plástico: Se usan en embutidos cocidos.

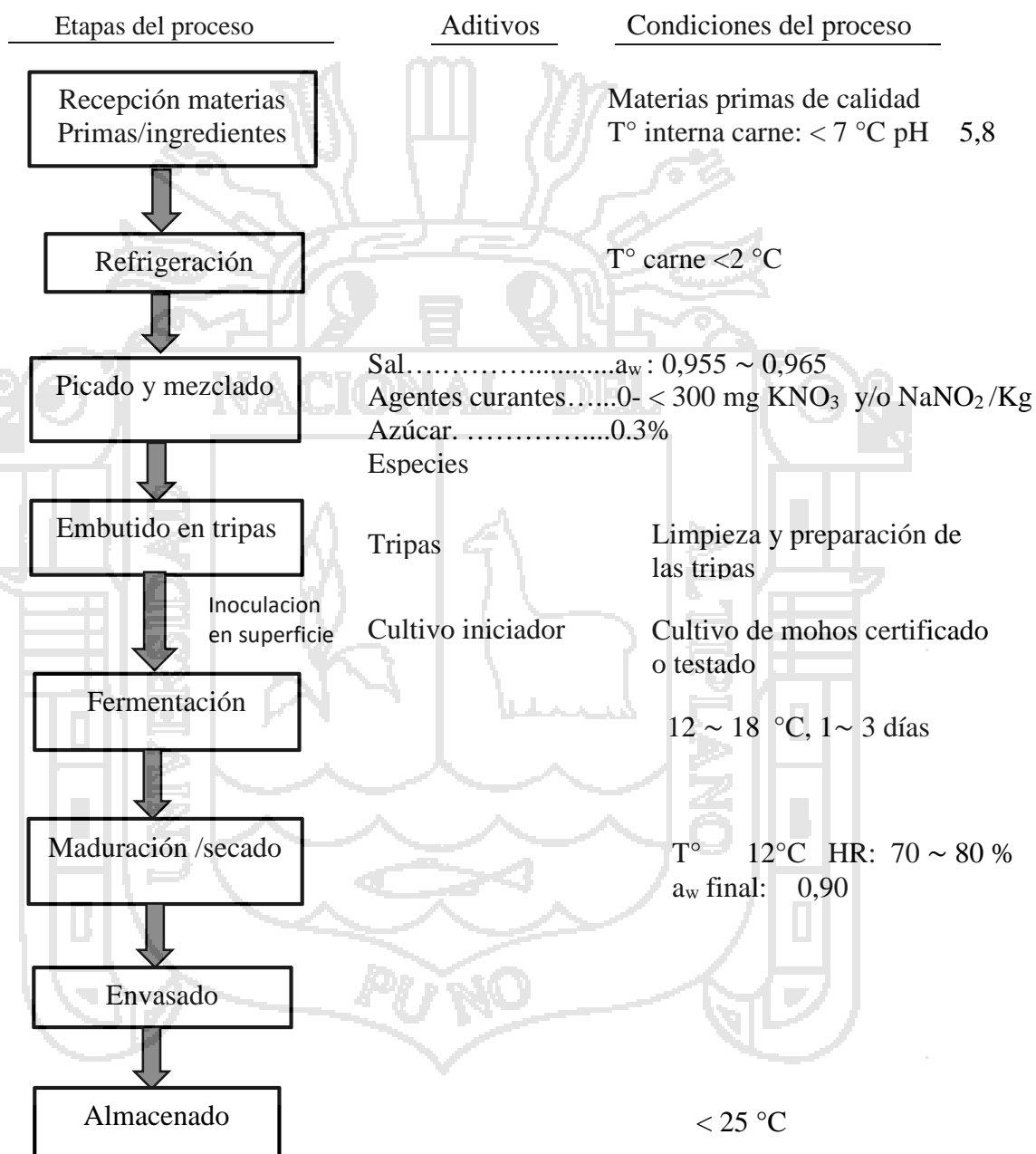
**2.3.2. Elaboración del embutido**

La base de la amplia variedad de embutidos crudos curados fermentados que existen en el mercado radica en una tecnología de fabricación flexible que permite realizar muchas modificaciones siempre que se mantengan las reducciones adecuadas de pH y  $a_w$  (Leistner, 1995).

La mayoría de los embutidos crudos curados se elaboran siguiendo un proceso similar. Los pasos más significativos se detallan en la Figura 1, que recoge desde la selección de materias primas hasta la maduración en secaderos. Se puede decir que la elaboración de embutidos se realiza en tres fases (Díaz, 1994b):

- Picado y mezcla de ingredientes
- Fermentación
- Maduración o secado

**Figura 1:** Diagrama de flujo de elaboración de un embutido adaptado de Lücke (1998).





### 2.3.2.1. Picado y mezclado de los ingredientes

El picado de la carne puede realizarse en una picadora o en una cutter, es aconsejable que se lleve a cabo a bajas temperaturas entre  $-1 \sim -3$  °C, de forma que el corte sea limpio y no se libere grasa intramuscular en las carnes. Las carnes empleadas deben tener valores de pH entre  $5,4 \sim 6,0$ . El grado de picado depende del tipo de producto que se va a elaborar. Tras esta operación se añaden el resto de ingredientes y se procede al amasado de la mezcla que, generalmente, se lleva a cabo en una amasadora para conseguir una distribución homogénea de todos ellos. La masa cárnica ya elaborada se deja reposar en refrigeración durante  $18 \sim 24$  horas, después de lo cual se embute (Mata, 1999 y Díaz, 1994b).

Tras mezclar todos los ingredientes, la pasta debe introducirse en las tripas para constituir las piezas de embutido. En esta operación debe facilitarse la salida del aire del interior de la tripa y comprimir para conformar la pasta. Las tripas deben ser permeables al vapor de agua y pueden ser artificiales (fibrosas, de colágeno) o naturales (Díaz, 1994b).

### 2.3.2.2. Fermentación

La fermentación es uno de los métodos más antiguos de conservación de alimentos utilizados por el hombre (Hansen, 2002).

Después de la embutición, las piezas se llevan a secaderos o cámaras con humedad y temperatura controlada, en las cuales se mantienen a temperaturas de  $20 \sim 28$  °C y humedades relativas del  $90 \sim 95\%$  durante  $24 \sim 72$  horas. De esta forma se facilita el crecimiento de los

microorganismos y se evita la formación de una costra externa, que aparecería en el caso de utilizar humedades relativas más bajas, lo que dificultaría el secado posterior de los embutidos (Mata, 1999 y Acevedo, 2004).

Los embutidos fermentados se caracterizan por su bajo valor de humedad y de actividad de agua ( $a_w$ ), y por la presencia de ácido láctico en concentraciones que confieren al producto un sabor característico. El procesamiento de estos productos tiene como principios básicos la utilización de métodos combinados de conservación, permitiendo la obtención de un producto estable a temperatura ambiente (Franco, *et al.*, 2002).

En el proceso de fermentados de los productos cárnicos curados intervienen de manera fundamental las *bacterias ácido lácticas* y muy especialmente los *lactobacilos*. En estos embutidos se desarrollan un proceso fermentativo que paulatinamente transforma el producto en base fundamental a la producción de ácido láctico, se abordara ampliamente en el apartado 2.4.2.1 (Martin, 2005).

### **2.3.2.3. Maduración**

La cámara o sala de maduración debe tener una temperatura de 12 ~ 16 °C y una humedad relativa de 70 ~ 85%. Es en estas condiciones donde el producto cárnico madurado adquiere todas las características organolépticas que lo distinguen y lo transforman en un producto de alta calidad y gran aceptabilidad. El tiempo de maduración es indeterminado, ya que el secado de los embutidos madurados dependerá de las características

de la tripa, condiciones de la pasta, además se debe esperar que el producto alcance su color rojo óptimo (Rodríguez, 2011).

La correcta desecación del embutido depende de varios factores entre los que cabe destacar (Mata, 1999):

- Temperatura y humedad relativa (HR) ambiental.
- Velocidad de circulación de aire.
- Composición de la masa original.
- Grado de picado.
- Calibre del embutido.
- pH.

Durante el periodo de maduración se producen reacciones enzimáticas, fundamentalmente de origen microbiano, que degradan lípidos y proteínas. También se produce una fuerte deshidratación y se desarrolla la textura característica, el contenido en agua desciende hasta el 35% o incluso menos, reduciéndose la actividad de agua por debajo de 0,90. Bajo estas condiciones, el crecimiento bacteriano se inhibe si se evita la condensación de agua en la superficie del embutido, hacia el final de la maduración se produce un ligero incremento del pH, debido principalmente a la acumulación de productos de degradación de las proteínas, se abordara ampliamente en el apartado 2.4.2.2 (Lucke, 1998).

## 2.4. CAMBIOS BIOQUÍMICOS DURANTE LA MADURACIÓN DE LOS EMBUTIDOS FERMENTADOS

### 2.4.1. Modificaciones físicas

#### 2.4.1.1. Cambios en el pH

El pH de la carne es una característica fisicoquímica importante en la conservación de éste alimento, debido a que en carnes frescas sometidas a fermentación láctica la reducción del pH provoca inhibición de la flora contaminante. El pH de los embutidos fermentados está principalmente determinado por el lactato, el amonio y el contenido de agua que interacciona con las proteínas de la carne; estos factores explican el 75 % de las variaciones de pH. El descenso del pH tiene varios efectos beneficiosos: reduce la capacidad de retención de agua favoreciendo la deshidratación del producto, inhibe el desarrollo de microorganismos patógenos y proteolíticos que pueden entorpecer el proceso de maduración del embutido, interviene en el proceso de enrojecimiento favoreciendo la reducción del nitrito a óxido nítrico, facilita la gelificación de las proteínas cárnicas garantizando la correcta ligazón y consistencia del embutido, y por último, la presencia de ácidos orgánicos contribuye al aroma del producto final (Mata, 1999).

El descenso más rápido de pH se produce en el segundo día de maduración, coincidiendo con los mayores niveles de desarrollo microbiano, en el tercer día comienza una fase estacionaria que experimenta un ligero incremento a partir del día 14 (Bello y Sánchez 1997).

La obtención de un producto final de calidad depende de la velocidad e intensidad de la disminución del pH que, a su vez, depende de un gran número de factores; de los que se relacionan a continuación los más destacables (Liepe *et al.*, 1990):

- Adición o no de cultivos iniciadores.
- Cantidad de azúcar.
- Tipo de azúcar, en relación con el tipo de cultivo iniciador añadido.
- Temperatura de las cámaras de maduración en la etapa inicial del proceso de desecación.

Como se ha mencionado anteriormente, el pH del medio afecta al crecimiento microbiano. Muchas bacterias crecen óptimamente a pH próximos a 7 y lo hacen poco a pH inferiores a 4 o superiores a 9. El pH de la carne post-mortem oscila entre 7 ~ 5,5, por lo que es evidente que el crecimiento microbiano en estas condiciones puede ser muy intenso. En las carnes curadas es deseable un pH ácido, ya que al incrementarse la concentración de nitrito que se encuentra en forma no disociada como ácido nitroso, la concentración de éste es necesaria para controlar el crecimiento de determinadas especies patógenas. Así por ejemplo, la cantidad de nitrito para inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* cuando el pH final es de 5,5 es veinte veces inferior de lo que requiere a pH 6,9 (Díaz, 1994b).

El pH final de los embutidos crudos curados varía significativamente de un tipo de producto a otro, así en el caso del salami

alemán los valores de pH son próximos a 4,8 aunque en las regiones del sur del país se producen generalmente embutidos menos ácidos que en el norte. En Australia, los embutidos son poco ácidos, el pH puede ser superior a 6,0 e incluso llegar a 7,4 como en el salametti. En Francia también se prefieren embutidos de escasa acidez, con valores de pH final cercanos a 6,0 (Krockel, 1995).

En España los consumidores muestran una preferencia por productos poco ácidos, aunque el rango de pH de embutidos españoles está comprendido entre 4,5 ~ 5,5 (Roncalés, 1994).

Con el fin de establecer un mejor control del proceso de fermentación en presencia de cultivos iniciadores, calcularon el grado de acidificación (pH/hora) para distintos microorganismos y observaron que a temperaturas más elevadas la relación se ve más afectada por el descenso de  $a_w$  y por el tipo de cepa usada. La  $a_w$  mínima para la acidificación osciló entre 0,93 para la flora espontánea y 0,91 para las cepas de cultivos iniciadores. Asimismo las temperaturas elevadas incrementan más el grado de acidificación para los cultivos puros que para la flora espontánea. Por otro lado, el grado de picado y la concentración de glucosa en exceso no influyen en la acidificación aunque sí lo hace la inoculación de un mayor número de células viables (Landvogt y Fischer, 1990).

#### 2.4.1.2. Cambios en la actividad de agua

La carne fresca tiene una  $a_w$  próxima a 0,99 pero cuando va a utilizarse para la producción de embutidos fermentados debe disminuirse hasta 0,96 ~ 0,97. Tecnológicamente esto se logra mediante la adición de cloruro sódico, nitrito y azúcares, también el empleo del 25 ~ 30 % de grasa reduce la  $a_w$  de la mezcla inicial. Con esta disminución de la  $a_w$  se previene el crecimiento de muchos microorganismos (principalmente microorganismos Gram negativos (aeróbicos) lo cual favorece el desarrollo de la *flora láctica*, *micrococos* y *estafilococos* no patógenos. Posteriormente el proceso de desecación-maduración provoca la pérdida de agua y permitirá llegar a los rangos de  $a_w$  finales de 0,784 ~ 0,894 (Mata, 1999).

El rango de  $a_w$  para embutidos fermentados oscila entre 0,83 ~ 0,96 con una media de 0,91. En estos rangos de  $a_w$  se pueden considerar estos productos como alimentos de humedad intermedia (AHI) que incluye a todos aquellos que se encuentran entre el intervalo de 0,60 ~ 0,90 de  $a_w$ . Los AHI se caracterizan por ser productos con un contenido acuoso intermedio entre los frescos y los deshidratados, que no necesitan rehidratación para ser consumidos y que son estables a temperatura ambiente (Rojas *et al.*, 1991).

En general, los microorganismos responsables de las toxiinfecciones alimentarias son incapaces de crecer cuando la  $a_w$  es inferior a 0,91, a excepción del *Staphylococcus aureus* en aerobiosis, que puede desarrollarse

incluso a  $a_w$  de 0,860. También determinadas especies de levaduras y mohos pueden crecer a  $a_w$  inferiores a 0,75 (Mata, 1999).

La pérdida de humedad debe ser un proceso gradual, equilibrado con el proceso paralelo de maduración, que permita la difusión de las moléculas de agua desde las zonas más internas del embutido hasta el exterior. La  $a_w$  de las carnes fermentadas varía dependiendo del grado de picado de la carne, del tiempo de maduración, del contenido de sal y azúcar, de la permeabilidad de la tripa, temperatura y humedad relativa del aire. (Frey, 1995).

#### **2.4.2. Modificaciones bioquímicas**

##### **2.4.2.1. Cambios en los hidratos de carbono**

La fermentación de los hidratos de carbono se produce con mayor intensidad en las primeras fases de maduración y se origina por la acción de las *bacterias lácticas* presentes en el embutido de forma natural o añadidas intencionadamente, dando lugar principalmente a ácido láctico. Este proceso va a producir la reducción del pH necesaria para evitar el crecimiento de los microorganismos alterantes y patógenos y garantizar la seguridad sanitaria del producto. También ejerce una función tecnológica ya que de este modo se alcanza el punto isoeléctrico de las proteínas reduciendo la capacidad de retención de agua, lo que facilita el secado y el desarrollo de la consistencia típica de estos productos. Los ácidos mayoritarios generados son, el láctico y en mucha menor medida al acético, y son también responsables del sabor ácido del embutido (Díaz, 1994b).



La fermentación de los carbohidratos en los embutidos madurados se puede realizar de dos formas: por la vía homofermentativa o heterofermentativa dependiendo de las especies microbianas fermentadoras y de las condiciones del cultivo, en determinadas condiciones de aerobiosis o anaerobiosis los microorganismos pueden tener un comportamiento diferente. Las bacterias lácticas de interés en la industria cárnica son heterofermentadoras facultativas, pueden seguir las dos vías pero, en general, en presencia de glucosa siguen la vía homofermentadora produciendo exclusivamente ácido láctico (Garriga *et al.*, 1996).

Los azúcares de bajo peso molecular (monosacáridos y disacáridos) son metabolizados antes y con mayor rapidez que los de peso molecular elevado (polisacáridos), estos últimos se acumulan formando una reserva azucarada. Los distintos azúcares son utilizados de manera diferente por la microflora de los embutidos, así la glucosa puede ser aprovechada por todos los *lactobacilos*, mientras que la sacarosa y maltosa sólo puede ser utilizada por el 80 % y 29 % de las cepas, respectivamente (Prändl *et al.*, 1994).

#### **2.4.2.2. Cambios en las proteínas y proteólisis**

Durante la maduración de los embutidos, las proteínas y, en general, los compuestos nitrogenados sufren una serie de transformaciones debidas tanto a la acción de los microorganismos como a factores propios de la carne y a la tecnología aplicada durante la fabricación del producto (Díaz, 1994b).

Durante el picado de la carne se produce una ruptura más o menos intensa de las fibras musculares, con lo que las proteínas miofibrilares, que constituyen el 83 % del contenido celular, quedan expuestas a la acción de la sal. La presencia de sal facilita los procesos electrostáticos implicados en la formación de la película proteica que rodea los glóbulos grasos y favorece el establecimiento de interacciones proteína-grasa y proteína-proteína. (Cid *et al.*, 1992).

A lo largo del período de fermentación, el NaCl, el aumento de la temperatura (22~26 °C) y el descenso del pH provocan la insolubilización de las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares. La insolubilización continúa en el periodo de maduración. Aunque el pH detiene su descenso e incluso aumenta ligeramente hacia el final y la temperatura es inferior (11~15 °C), la deshidratación se prolonga debido a la baja humedad relativa del entorno, ocasionando una disminución de la interacción proteína-agua y dificultando la solubilización. Esto conlleva un incremento de la concentración de NaCl que contribuye, por su elevada fuerza iónica, a la desnaturalización de las proteínas de la carne, especialmente las miofibrilares, produciendo cambios profundos en su estructura. Las proteínas disueltas por efecto del picado y la adición de sal dan lugar a agregados en forma de filamentos que interaccionan entre sí, lo que contribuye a la estabilidad del gel (Díaz, 1994b).

La proteólisis es un proceso bastante complejo en el cual participan dos grandes grupos de enzimas; la proteasas de tipo endopeptidasas ( $\mu$ -calpaina (I), m-calpaina (II), catepsinas B, D, H y L y proteosoma) y las

exopeptidasas (Tri-peptidilpeptidasas I y II, dipeptidilpeptidasas I, II, III y IV, carboxipeptidasas y alanil-, arginil-, metionil-, leucil-, y piroglutamil-aminopeptidasas) (Toldrá, 1998b).

La proteólisis de los embutidos fermentados afecta directamente la percepción sensorial de los mismos, al producir un incremento en la concentración de péptidos y aminoácidos, que están estrechamente relacionados con el sabor e indirectamente con el aroma, además tiene un impacto sobre la textura al ser responsable de la hidrólisis de las proteínas miofibrilares (Toldrá, 1998b).

El sabor de la carne viene determinado por compuestos hidrosolubles, entre los que se encuentran los aminoácidos, péptidos, nucleótidos, azúcares y ácidos orgánicos, la función que los aminoácidos y los péptidos tienen en el sabor, establecen cinco sabores primarios; dulce, ácido, salado, amargo y umami. El sabor “umami” o de caldo de carne, es también descrito como una sensación de llenado de boca y su representante más típico lo encontramos en la sal sódica del ácido glutámico (glutamato monosódico), ampliamente utilizado en la industria como potenciador del sabor. Otros compuestos, como son los dos dipéptidos naturales carnosina ( - Alanina - Histidina) y anserina ( -Alanina-1-metil-histidina) presentes en la carne, contribuyen al sabor amargo. En la tabla 3, se muestra el sabor que pueden proporcionar diferentes sustancias presentes o generadas en el curado de embutidos (Toldrá, 1998b).

**Tabla 3.** Sabores de los componentes resultantes de la actuación enzimática

Sabor	Componentes
Dulce	Glicina, alanina, serina, treonina, lisina, prolina, hidroxiprolina, glucosa, fructosa y ribosa.
Ácido	Ácidos aspártico, glutámico, histidina, asparagina, láctico, succínico y pirúvico
Amargo	Creatina, creatinina, hipoxantina, anserina, carnosina, fenilalanina, arginina, metionina, histidina, valina, leucina, isoleucina, triptofano y tirosina.
Salado	Glutamato y aspartato.
Umami	Glutamato y aspartato monosódico.

**Fuente:** (Toldrá, 1998b).

Aunque la hidrólisis primaria de las proteínas a polipeptidos es realizada mayoritariamente por las enzimas musculares endógenas. Las BAL y los *micrococcus*, tienen cierta actividad proteolítica y pueden contribuir a la degradación de las proteínas musculares, en mayor medida sobre las proteínas miofibrilares. Incluso, se ha señalado que las enzimas intracelulares (amino, di- y tripeptidasas) de *Lactobacillus* son las responsables de la generación de pequeños péptidos y aminoácidos que contribuyen al proceso, ya sea como potenciadores del sabor o como precursores de otros compuestos aromáticos durante la maduración de los embutidos fermentados. Los agentes de curado y las condiciones de proceso (temperatura, pH, duración del proceso) en estos productos actúan como reguladores de la actividad de las exopeptidasas (Sanz *et al.*, 1999a).

El pH controla en mayor grado la hidrólisis, los embutidos fermentados con pH más ácidos (4.60) se caracterizan por una alta concentración de péptidos y poca producción de amoníaco, debido en gran medida a la catepsina D, que es activa a pH ácidos. La sal (2~3 %) inhibe parcialmente a las catepsinas pero activa a las calpainas y aminopeptidasa B. Durante el secado y maduración se incrementa el contenido de los péptidos de bajo peso molecular y los aminoácidos libres que mediante reacciones químicas y/o enzimáticas como la descarboxilación, desaminación, deaminación y transaminación se generan compuestos volátiles y no volátiles de gran importancia en el desarrollo del aroma y sabor de estos productos. Además, en presencia de bacterias de deterioro inducirán en gran medida la descarboxilación de los aminoácidos, produciendo aminas biogénicas (Toldrá *et al.*, 2000a).

#### **A. Endopeptidasas**

Las endopeptidasas son enzimas proteolíticas tisulares responsables mayoritariamente de la degradación de proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas. El resultado de su actuación es la generación de fragmentos proteicos y peptídicos procedentes en su mayoría de la rotura de las proteínas miofibrilares que van a servir de sustrato para la actuación de las exopeptidasas (Toldrá 2000a).

#### **B. Exopeptidasas**

Las exopeptidasas son un grupo de enzimas proteolíticas caracterizados por hidrolizar las cadenas pépticas por sus extremos

terminales dando lugar a la liberación de péptidos y aminoácidos libres (Toldrá, 2000a).

### **C. Parcial solubilización de las proteínas miofibrilares**

Las proteínas solubles, tanto las sarcoplásmicas como las miofibrilares, experimentan durante la maduración de los productos cárnicos un proceso de desnaturalización que se manifiesta en un descenso en la cantidad de proteína solubilizada (Córdoba *et al.*, 1994).

## **2.5. MICROBIOLOGIA DE LOS EMBUTIDOS Y USO DE CULTIVOS INICIADORES**

La flora inicial del embutido es extremadamente variable y depende en gran medida de la carga microbiana de la carne utilizada como materia prima y de la contaminación ambiental. La carne es muy rica en nutrientes y factores de crecimiento, que junto a una alta actividad de agua 0.96 ~ 0.97 y un pH próximo a la neutralidad (5.6 ~ 5.8), constituye un sustrato idóneo para el crecimiento de un gran número de microorganismos. No obstante, las condiciones de la mezcla cárnica una vez embutida favorecen el crecimiento de *bacterias lácticas* y *Micrococcaceas* (Mata, 1999).

Rápidamente, se produce la acidificación por fermentación alcanzándose un bajo pH que evita el crecimiento de las bacterias indeseables, fundamentalmente el de las *enterobacterias* y entre ellas, *Salmonella* y *Escherichia coli* (Mata, 1999).

### **2.5.1. Cultivos iniciadores**

Los cultivos iniciadores son empleados con el fin de conseguir en el producto cárnico propiedades físico-químicas y sensoriales determinadas, entre las que se cuentan, el desarrollo y la estabilidad del color típico, un descenso rápido

del pH por la producción de ácido láctico, una adecuada cohesividad de las pastas para obtener un grado de consistencia más firme, un grado de terneza adjudicado a la autólisis de las proteínas cárnicas y un aroma característico. (Schillinger, 1996).

El primer cultivo iniciador que apareció en el mercado, con aplicación en la industria cárnica, fue una cepa de *Pediococcus cerevisiae* que comercializó la firma Merck en Estados Unidos en 1957, para la elaboración de embutidos de verano y embutidos untables. Casi paralelamente, en Alemania en 1961 se comercializó una cepa de *Micrococcus* M53, suministrada por la compañía Rudolf Muller y en 1966 aparece por primera vez un cultivo iniciador que combina *Lactobacillus plantarum* con una cepa de *micrococos* las diferencias entre las cepas seleccionadas en Europa y Norteamérica se basan en los distintos gustos de sus consumidores. En USA el fabricante apuesta por procesos de acidificación más rápidos, con temperaturas de maduración de 38 ~ 40°C, que originan productos de sabor más ácido que es lo que prefieren los consumidores, en cambio en Europa se apuesta por los productos de maduración más lenta, con temperaturas bajas en torno a los 20°C, que permiten el desarrollo máximo de las características sensoriales típicas de estos productos (Mata, 1999).

La finalidad con la que se añaden los cultivos iniciadores a los embutidos secos se puede resumir de la siguiente manera (Díaz, 1994b):

- Control del proceso madurativo.
- Inhibición de microorganismos no deseables.
- Reducción de riesgos sanitarios.
- Incremento de la calidad y normalización.
- Control del sabor y aroma

### 2.5.2. Microorganismos que componen los cultivos iniciadores

Son numerosos los géneros microbianos utilizados en la composición de los cultivos iniciadores. Aunque los más empleados pertenecen al grupo de las bacterias ácido láctico y las micrococáceas, se ha propuesto la utilización de otros géneros bacterianos como *Escherichia*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Corynebacterium*. También se utilizan determinadas especies de levaduras y mohos como flora de superficie, aunque la finalidad en este caso es fundamentalmente de aromatización y mejora de la apariencia externa. Las especies más utilizadas como componentes de cultivos iniciadores se presentan en la tabla 4 (Hammes y Tichaczek, 1994).

**Tabla 4.** Microorganismos usados como cultivos iniciadores para embutidos curados.

Grupo microbiano	Especies usadas como iniciadores
Bacterias ácido lácticas	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus pentosus</i> , <i>Lactobacillus sake</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i>
Micrococáceas	<i>Staphylococcus carnosus</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i> y <i>Micrococcus varians</i>
Levaduras	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Candida famata</i>
Mohos	<i>Penicillium nalgiovensis</i> , <i>Penicillium crysogenum</i>

**Fuente:** (Hammes y Tichaczek, 1994).



### 2.5.2.1. Bacterias ácido lácticas

Las BAL poseen características ecológicas y metabólicas de importancia económica y tecnológica en los alimentos. Su clasificación se basa en la morfología, la forma de fermentar la glucosa, su desarrollo a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, la habilidad de crecer a altas concentraciones de sal, tolerancia a la alcalinidad y acidez (Axelsson, 2004; Feria y Pedro, 2007).

En la actualidad, el grupo de las BAL está conformado por cocos, cocobacilos o bacilos Gram positivos, generalmente inmóviles y no esporulados, catalasa y oxidasa negativas, obtienen energía exclusivamente por fermentación de azúcares produciendo ácido láctico como producto principal o único de su metabolismo, y obtienen su energía por fosforilación a nivel del sustrato a la vez que oxidan carbohidratos; no tienen un ciclo de Krebs funcional. Todas estas bacterias son consideradas anaerobias aerotolerantes, y al contrario que las anaerobias estrictas, no son sensibles al oxígeno por lo que pueden crecer tanto en presencia como en ausencia de él (Madigan *et al.*, 2004).

Las bacterias del ácido láctico (BAL) son el grupo bacteriano de mayor importancia en el proceso de elaboración de embutidos fermentados. Estos microorganismos, especialmente el género *Lactobacillus*, son los responsables de la producción de ácido láctico durante la fermentación, provocando así una disminución del pH (Hugas *et al.*, 1993).

Las BAL se desarrollan rápidamente durante el proceso fermentativo y evolucionan desde  $10^3 \sim 10^4$  ufc/g hasta  $10^8 \sim 10^9$  ufc/g

manteniendo en estos niveles hasta el final de la maduración (Hugas *et al.*, 1993 y Leistner, 1995).

Los *lactobacilos* son el género que predomina de forma natural en este tipo de productos y en carnes envasadas al vacío, por tanto, las cepas aisladas de estos productos que se utilizan como cultivos iniciadores, están mejor adaptadas y se desarrollan más (Fadda *et al.*, 2008).

#### 2.5.2.2. *Micrococaceas*

Las *micrococáceas* son el segundo grupo de bacterias en importancia para la constitución de los cultivos iniciadores. Los dos géneros que incluyen estas familias son, *Micrococcus* y *Staphylococcus*.

Los *Staphylococcus* se ha constituido como el género más utilizado debido a su capacidad para crecer y metabolizar bajo condiciones anaeróbicas. Las especies que suelen formar parte de los cultivos comerciales son *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus carnosus* y *Micrococcus varians*.

A diferencia de las bacterias lácticas estos microorganismos se caracterizan por poseer la enzima catalasa, ser sensibles a los ácidos y tolerar mejor condiciones de baja  $a_w$ . (Weidenfeller y Fegeler, 1990).

En cuanto a los beneficios tecnológicos que reporta la utilización de *micrococáceas* como cultivos iniciadores figura la contribución a la formación y estabilización del color y su participación en la formación del aroma. En general, estas bacterias poseen la enzima nitrato reductasa, la cual reduce el nitrato a nitrito que posteriormente será utilizado junto a la mioglobina para formar la nitrosilmioglobina o pigmento rojo del curado.

Pero además de participar en la reacción de enrojecimiento, estas bacterias estabilizan el color, ya que poseen la enzima catalasa que desdobra el peróxido de hidrógeno, procedente de fuentes químicas y microbianas, y cuya acumulación en el embutido origina fenómenos de decoloración en el mismo. A menudo se ha cuestionado la participación de las *micrococáceas* en las reacciones de aromatización de productos crudos curados, no obstante muchos autores han demostrado la actividad lipolítica y proteolítica de determinadas cepas de *Micrococcus* y *Staphylococcus* que favorecería la formación de compuestos precursores del aroma (Carrascosa y Cornejo, 1991).

## 2.6. CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DE LOS EMBUTIDOS

Las características sensoriales (color, textura, sabor y aroma) del producto final vienen definidas por complejas transformaciones químicas y enzimáticas (musculares y microbianas) de los hidratos de carbono, proteínas y lípidos de la masa cárnica inicial, todas ellas moduladas por las condiciones físicas concretas en las que se lleva a cabo el proceso, así como por el efecto de las especias y de los agentes de curado (Mata, 1999).

El color es una propiedad sensorial muy importante en estos productos ya que influye en gran manera en su aceptación por parte de los consumidores. La presencia de nitrito, ascórbico o de microbiota con actividad nitratorreductasa (*Micrococccaeae*) favorecen la formación de nitrosomioglobina, otorgándole al embutido el color característico (Minor, 1999).

Mientras que el aroma y sabor son resultado de una combinación equilibrada entre los compuestos volátiles (alcohol, acetonas, aldehidos y furanos) y no volátiles

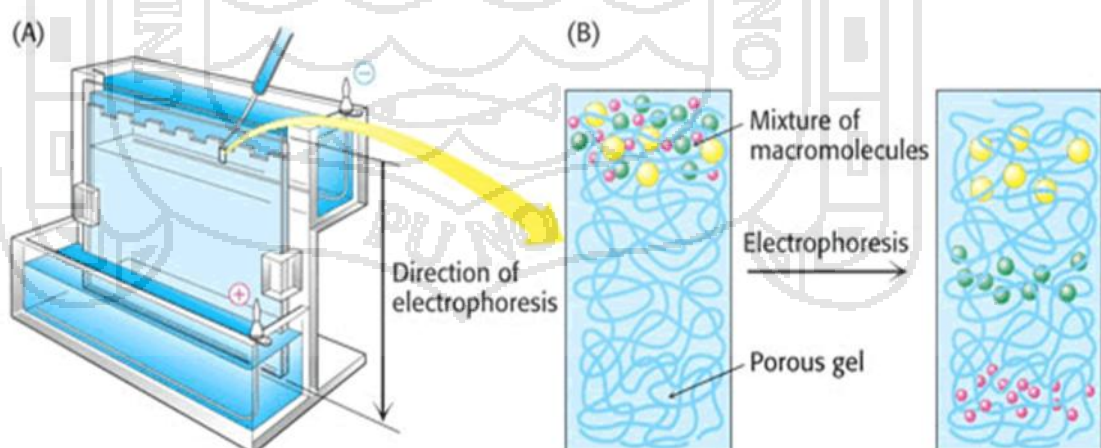
(aminoácidos, péptidos, azúcares y nucleótidos) procedentes de las materias primas o generados a partir de las reacciones bioquímicas (proteólisis) que suceden durante la maduración como se mencionó en él, apartado 2.4.2.2 (Toldrá, 1998b).

El desarrollo de la textura se debe a la acumulación de ácido láctico, producto de la fermentación de carbohidratos. Como consecuencia de esto, el pH desciende hasta valores que se aproximan al punto isoelectrónico de las proteínas miofibrilares reduciendo su CRA con el consecuente incremento de la firmeza de la masa cárnica (Gimeno *et al.*, 1999).

## 2.7. TÉCNICA ANALÍTICA EMPLEADA

### 2.7.1. Electroforesis

Esta técnica de análisis se fundamenta en el hecho de que algunos polímeros biológicos como las proteínas tienen la capacidad de ionizarse y cuando son sometidos a un campo eléctrico pueden migrar hacia el polo de carga contraria (Badui, 1991).



**Figura 2.** Equipo electroforético (Badui, 1991).

En las proteínas la presencia de aminoácidos en forma de iones a un pH determinado hace que esta se desplazase hacia el ánodo o cátodo, dependiendo de la carga neta de la proteína y aunque en forma menos significativa el tamaño y la forma de la molécula. La velocidad o movilidad de migración en el campo eléctrico al que son sometidas las proteínas es característico para cada uno de ellas y se mide con respecto a una sustancia de referente peso molecular (Baduí, 1991).

Para el análisis de proteínas de carne se utiliza el método de electroforesis en gel de poliacrilamida. Este método corresponde a una electroforesis desnaturalizante, donde la función del detergente iónico (cargado negativamente) Dodecil Sulfato de Sodio (SDS), es desnaturalizar las proteínas, rompiendo la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria mediante la ruptura de los puentes hidrófilos, lo que facilita la migración hidrófoba (Badui, 1991).

Este detergente es absorbido en la superficie de las cadenas polipeptídicas confiriéndoles a estas una carga negativa. Cada polipéptido absorberá una cantidad de SDS proporcional a su tamaño. Formando un complejo SDS-proteína que tienen la misma relación carga-masa dando origen a una movilidad electrofóretica herte y un tiempo de separación corto. Otra ventaja es que las velocidades diferentes de migración dependerán del tamaño de polipéptido y no de su carga (Minor, 1999).

Los más pequeños se moverán más rápido que los de menor tamaño a través de la matriz del gel de poliacrilamida (PAGE). Con la electroforesis puede calcularse el peso molecular de distintos compuestos, para lo que se utilizan estándares de peso molecular conocido (Minor, 1999).

## 2.8. VIDA ÚTIL DE PRODUCTOS CÁRNICOS

La vida útil (VU) es un período en el cual, bajo circunstancias definidas, se produce una tolerable disminución de la calidad del producto. La calidad engloba muchos aspectos del alimento, como sus características físicas, químicas, microbiológicas, sensoriales, nutricionales y referentes a inocuidad. En el instante en que alguno de estos parámetros se considera como inaceptable el producto ha llegado al fin de su vida útil (Morales, 2008).

La finalidad de cualquier fábrica de embutidos consiste en elaborar productos confiables desde el punto de vista sanitario, con buena presentación, uniformes, que agraden a los consumidores y a precios lo más reducidos posibles. De esta forma se garantiza la permanencia en el mercado, y se facilita el aumento en las ventas (OEA, 2003).

La desecación que sufren los embutidos secos, por sí misma, garantiza su inocuidad sin un tratamiento térmico adicional cuando están acordes con la regulación establecida (Frey, 1995).

La vida útil se determina al someter a estrés el producto, siempre y cuando las condiciones de almacenamiento sean controladas. Se pueden realizar las predicciones de vida útil mediante utilización de modelos matemáticos (útil para evaluación de crecimiento y muerte microbiana), pruebas en tiempo real (para alimentos frescos de corta vida útil) y pruebas aceleradas (para alimentos con mucha estabilidad) en donde el deterioro es acelerado y posteriormente estos valores son utilizados para realizar predicciones bajo condiciones menos severas. Es importante recalcar que la vida útil no es función del tiempo en sí, sino de las condiciones de almacenamiento del producto y los límites de calidad establecidos

tanto por el consumidor como por las normas que rigen propiamente los alimentos (Pólit, 2006).

### 2.8.1. Principales factores de deterioro

A continuación se numeran algunos de los factores que causan el deterioro de los alimentos (Carballo y Larrañaga, 1998; Pólit, 2006):

- **Factores Microbiológicos:** Los microorganismos pueden causar deterioro de la calidad de los productos (cambios de aspecto, textura y sabor). Los valores límites de contaminación aceptables en los alimentos pueden tomarse de tablas definidas por el Codex Alimentarius u otros organismos nacionales o internacionales.
- **Temperatura:** El principal efecto de la temperatura en el deterioro de los productos tiene relación con la velocidad a la que se producen las reacciones de oxidación de grasas, cambios de color, de sabor.
- **Cambios de humedad:** Los intercambios de humedad del producto con el medio ambiente, pueden causar alteraciones físicas (textura, aglomeración), alterar el sabor de los productos o permitir el desarrollo de hongos y bacterias.
- **Condiciones de materias primas y procesamiento:** Una falta de control adecuado en todos los procesos de fabricación afectará necesariamente la estabilidad y por lo tanto la vida útil de un producto.

### 2.8.2. Determinación de la cinética de deterioro

Según investigaciones planteadas por diferentes autores es difícil realizar una estimación del tiempo aceptable de almacenamiento. El modelo que

generalmente se utiliza para este tipo de estudios es el de Arrhenius, asumiendo que las reacciones siguen cinéticas de primer orden. También se puede aplicar un modelo lineal de reacción de orden cero (Domínguez, 2007).

La metodología de trabajo consiste en identificar primero las reacciones químicas y biológicas que influyen en la calidad y seguridad del alimento. Entonces, a través de un estudio cuidadoso de los componentes del alimento y del proceso, se determinan las reacciones que se considera que presentan el impacto más crítico (Labuza, 1994).

En estos casos, bastante comunes, y los únicos que se consideran en la práctica, la velocidad de estas reacciones hipotéticas se puede expresar en función de una pseudo constante  $k$  y un pseudo orden  $n$ .

Según:

$$\pm \frac{dQ}{dt} = KQ^n \dots\dots\dots(1)$$

Tomando el signo según sea el atributo de calidad un componente que se pierde (ej. una vitamina) o un producto de degradación que aparece. Esta simplificación da lugar a la siguiente clasificación (Labuza, 1994).

### 2.8.2.1. Reacción de orden cero

La relación lineal entre el atributo y tiempo se obtiene cuando la reacción es de orden cero  $n = 0$ , tendremos:

$$\pm \frac{dQ}{dt} = k \dots\dots\dots(2)$$



Integrando la ecuación se obtiene:

$$Q = Q_0 - kt \dots\dots\dots(3)$$

Dónde:

$Q_0$  = Valor inicial del atributo de calidad

$Q$  = Valor que toma dicho atributo después de transcurrido el tiempo

$t$ .

Si al final de la vida útil  $t_f$ , se alcanza cuando el atributo de calidad toma un cierto valor, llamado  $Q_f$ , tendremos:

$$Q_f = Q_0 - k * t_u \dots\dots\dots(4)$$

En consecuencia, la vida útil, será:

$$t_u = \frac{Q_0 - Q_f}{k} \dots\dots\dots(5)$$

$Q_f$  = Concentración final del factor al tiempo  $t$ .

$Q_0$  = Concentración inicial del factor al tiempo 0.

$t$  = Tiempo de estabilidad (días).

$k$  = Constante de velocidad a la temperatura estudiada.

El empleo de una ecuación de orden cero es útil en la descripción de procesos tales como la degradación enzimática, el pardeamiento no enzimático y la oxidación de los lípidos que lleva al desarrollo de olores rancios (Labuza, 1994).

### 2.8.3. Variables que determinan la vida útil de los embutidos

#### 2.8.3.1. Pérdida de peso

Una de las características principales de los embutidos fermentados es que son productos desecados. Durante la maduración se producen pérdidas

de agua que conllevan a una reducción del peso (mermas) que puede oscilar entre un 20 ~ 40 % del peso inicial (Liestener, 1995).

Uno de los factores importantes para establecer el periodo de maduración se debe considerar el, porcentaje de humedad, que estos deben presentar en un rango de 20 ~ 30% de su peso inicial (Price, 1994 y Varman *et al.*, 1998).

La pérdida de peso del embutido se debe a la diferencia de humedad. Es importante que exista siempre una diferencia de humedad (gradiente) entre el interior del embutido y el aire circundante. El valor de pH ejerce influencia sobre la cesión de agua por parte de la carne. Si el pH se encuentra en la proximidad del punto isoelectrico, el musculo cede la máxima cantidad de humedad el embutido se seca entonces de forma óptima, ganando consistencia y capacidad de conservación (Frey, 1995).

#### 2.8.3.2. Calidad microbiológica

- *Staphylococcus aureus*

Agente causal de intoxicación alimentaria. Hábitat y distribución: En el hombre el principal reservorio de este microorganismo es la cavidad nasal, desde donde pasa a la piel. También se encuentra en ojos, garganta y tracto gastrointestinal. Desde cualquiera de estas localizaciones, pasa a contaminar los alimentos (Sofos, 1994).

Necesidades de crecimiento: Microorganismo anaerobio facultativo, en general, mesófilo, pero para la producción de enterotoxinas necesita una temperatura entre 40 y 45 °C. Resiste concentraciones de NaCl hasta de 20% en algunas cepas (Sofos, 1994).

pH mínimo : 4.8 con oxígeno

: 5.5 sin oxígeno

$a_w$  : 0.86 con oxígeno

: 0.90 sin oxígeno

Temperatura óptima : 21 ~ 36 °C

Entre los principales factores implicados en esta intoxicación se cuentan, la refrigeración insuficiente, las deficientes prácticas de higiene personal de los manipuladores del alimento, la cocción o tratamiento térmico insuficiente y la retención del alimento en dispositivos para mantenerlo caliente durante largos periodos de tiempo.

Entre los alimentos de origen cárnico implicados en esta intoxicación, se encuentran, las carnes preparadas de cerdo, pollo, pavo y res y los productos cárnicos curados semisecos.

- ***Clostridium perfringens***

Agente causal de toxicoinfección, ya que produce la toxina cuando ha invadido el intestino de su huésped (Murano, 1997).

Hábitat y distribución: Este microorganismo se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y se transmite a los alimentos principalmente por las manos de los manipuladores contaminados y por

contaminaciones cruzadas con alimentos o recipientes que estuvieron en contacto con alimentos contaminados.

Necesidades de crecimiento: es un bacilo Gram positivo anaerobio y esporágeno, es mesófilo, tiene necesidades nutritivas relativamente complejas por la cantidad de aminoácidos que requiere para su desarrollo. Su crecimiento es inhibido por concentraciones de NaCl del 5% (Sofos, 1994).

Temperatura óptima : 43 ~ 47°C

pH : <5 o >9 no crece

$a_w$  : 0.97

Entre los factores implicados en esta enfermedad están las malas prácticas de higiene durante la manipulación, la refrigeración insuficiente o tardía, el almacenamiento inadecuado de alimentos preparados y las posibilidades de contaminación cruzada que se den en planta.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO

El presente estudio de investigación se realizó en las instalaciones de la Planta Piloto de Cárnicas de la Escuela profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional del Altiplano, ubicado en la ciudad de Puno, a una altura de 3827 msnm y una temperatura promedio de 16 °C.

Los diferentes análisis de las muestras fueron realizadas en los siguientes laboratorios:

- El material experimental (salchichas) se elaboraron en la Planta Piloto de Carnes de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial.
- Los análisis microbiológicos se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la E.P. de Ingeniería Agroindustrial.
- Los análisis físicos se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología de los Alimentos de la E.P. de Ingeniería Agroindustrial.
- El análisis de proteínas se realizó en el Mega- laboratorio, área de Biotecnología de los Alimentos de la UNA-Puno.
- Las pruebas sensoriales se realizaron en la Planta Piloto de Carnes de la E.P. de Ingeniería Agroindustrial.

#### 3.2. MATERIAL EXPERIMENTAL

- La carne de cerdo se adquirió en un centro comercial local. Se desconoce la edad, sexo y las condiciones post-mortem de los animales. Se utilizó la pierna de cerdo, la misma que fue adquirida ya retirada del cuerpo.

- La grasa de cerdo se adquirió en un centro comercial local. Después de comprarlo la carne y grasa estas fueron almacenadas en congelación por un día previo a la elaboración de la salchicha.
- Tripa natural de colágeno de calibre 30 mm de diámetro, marca Alíco. Suministrado por Alitécno S.A.C.- Arequipa.
- Sal se adquirió en un centro comercial local. La sal que se utilizó fue sal común, se la utilizó como conservador, a fin de que añada y acentúa sabor a los embutidos.
- Nitral sal curante al 20%, marca Alíco. comercializado por Alitécno S.A.C. – Arequipa. Se utilizó esta sustancia química con los siguientes propósitos: estabilizar el color de las salchichas, contribuyen a las características del sabor del producto y logra la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos y en particular del *Clostridium botulinum*.
- Azúcar blanca se adquirió en un centro comercial local.
- Cultivos Iniciadores, las cepas utilizadas fueron:
  - *Lactobacillus sakei*, (B-2) GIN 501116-SAFEPRO, 1 sobre de 25g equivalente para 200 kg de carne, en forma pura, procedente de Chr. Hansen. México.
  - *Staphylococcus carnosus*, (S-B-61) GIN 502360-BACTOFERM, 1 sobre de 25g equivalente para 100 kg de carne, en forma pura, procedente de Chr. Hansen. México.
  - *Staphylococcus carnosus* + *Lactobacillus sakei*, (F-FM-111) BACTOFERM, 1 sobre de 25g equivalente para 100 kg de carne, en forma mezclada, procedente de Chr. Hansen. Argentina.

Las fichas técnicas de estos productos se pueden observar en el anexo.

### 3.3. MATERIAL GENERAL DE LABORATORIO

#### 3.3.1. Instrumentos de laboratorio

- Cuchillo marca tramontina
- Espátula de acero inoxidable
- Fiólas 500 ml marca pírex
- Frasco lavador pizeta de polietileno boca angosta cap. 500ml
- Gradilla esterilizable sin alambre No-Wire
- Matraces Erlenmeyer, boca angosta graduado de 100, 250 y 500 ml marca pírex
- Mechero de alcohol
- Pinza para vasos con punta de vinillo en acero niquelado
- Pipetas automáticas de 1-10  $\mu$ l, 10 -100  $\mu$ l, 50 - 200  $\mu$ l, 100 - 1000  $\mu$ l y de 1- 5 ml utilizadas son de la marca BIOHIT.
- Pipetas serológicas (graduada) CLASEA de capacidad 1, 2, 5 y 10 ml
- Placas Petri marca STERIPLAN, en vidrio cal soda de  $\varnothing$  60
- Probeta graduada, con pie hexagonal y pico de 50, 100 y 250 ml marca pírex
- Tubo para cultivo con tapa rosca y junta de goma vidrio AR
- Vasos precipitado de forma baja, graduado con pico Beaker de 50, 100 ml

#### 3.3.2. Equipos

- Autoclave modelo LS-BSOL – II, volumen 50 L
- Balanza analítica precisión marca AND FR–300 Japón Cap. de 0.0001 a 310 g.
- Cocina eléctrica

- Conjunto para electroforesis Bio-Rad con kit para preparación de geles, cuba de corrida y fuente de poder
- Cuenta colonias
- Cubeta de electroforesis Verticales modelo. Miniprotean de Bio-Rad. con cristales, peines y separadores.
- Cutter, modelo CUE25, marca A &C Ingenieros; año de fabricación 2005, peso aproximado 250 Kg.
- Determinador de agua en productos ( $a_w$ ). Marca AQUALAB
- Embutidora Blander Stomacher 400 y Sorval Omni – mixer 17106.
- Estufa labor Muszeripari Muvek
- Estufa Universal e incubadoras marca “MEMMERT”
- Licuadora marca Oster Cap. 1L
- Molino de carnes Moulinex 320 MX
- pH-metro digital modelo HM – 5S.
- Refrigeradora
- Termohigrometro de vidrio de mercurio Escala interna, inmersión total rango  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Termómetro  $-5\sim 120^{\circ}\text{C}$  marca Pírex

### 3.3.3. Reactivos

- Disolución de SDS: 10 % en agua destilada
- N, N, N', N' – Tetrametil- etileno –diamina (TEMED) solución comercial Merck peruana S. A.
- Patrón de proteínas albúmina (84.2 kDa), ovoalbúmina (47.8 kDa),  $\beta$  –fosfato (110 kDa), anhidrasa carbónicaII (32.7 kDa) -lactoalbúmina (14,2kDa) y aprotinina (6,5 kDa). Merck peruana S. A.



- Tampón de electroforesis: contiene 14,4 g/l de glicina, 3 g/l de Tris (base) y 10 ml/l de SDS 10%. Merck peruana S. A.
- Tampón de Ruptura 5X que contiene: 2,5 ml de solución de dodecil sulfato sódico (SDS) 10%; 0,2 ml de 2 - -mercaptoetanol; 0,5 ml de azul de bromofenol 0,05%; 0,3 ml de tampón de electroforesis; 1 ml de glicerol y 0,5 ml de Tris 0,5 M pH 6,8. Merck peruana S. A.
- Tampón del gel acumulador: Tris 0,5 M; pH = 6,8 Merck peruana S. A.
- Tampón del gel separador: Tris 1M; pH = 8,8 Merck peruana S. A.
- Solución de acrilamida/bisacrilamida: Contiene 30 % acrilamida + 0.8 % bisacrilamida preparada en agua destilada Merck peruana S. A.

#### 3.3.4. Medios de cultivo

- Agar Man Rogosa Sharpe (MRS) marca Breitalia suministrada por Biosym E.I.R.L. peruana.
- Plate count agar (PCA) . Merck peruana S. A
- Agar VRBA (Agar con Bilis Rojo Neutro y Cristal violeta)
- Agua destilada
- Agua de peptona Merck peruana S. A.
- Mannitol sal agar
- Agar TSC (Tryptosa Sulfito Cicloserina)

### 3.4. MÉTODOS

#### 3.4.1. Metodología experimental

- **Preparación de los cultivos iniciadores**

Los cultivos iniciadores empleadas fueron *L. sakei*, *S carnosus* en forma pura suministrada por la firma Chr. Hansen (México) y *L sakei* + *S carnosus* en mezcla Chr. Hansen (Argentina). Estas cepas fueron seleccionadas en base a su capacidad de crecer y disminuir el pH rápidamente sobre la carne. Adquiridos en forma liofilizada, por lo que es importante rehidratarlos antes de su uso. Para realizar este proceso se empleó agua destilada esterilizada. Se utilizó 50 ml de agua destilada esterilizada, 0,5 g de sal común, el cultivo iniciador se agregó a una dosis recomendada por la fábrica siguiendo las instrucciones de las fichas técnicas, para el producto a elaborar, e incubándose posteriormente a 28 °C durante 12 horas previo al proceso.

- **Embutido**

Después de elaborada la masa cárnica, se la rellenó en tripa de natural de colágeno calibre 30 mm de diámetro. Es una tripa sintética que está constituida por celulosa natural. Lo que la hace resistente, además una de las características más importantes es su permeabilidad a la humedad, lo que en esta tripa se adhiera de forma correcta al embutido mientras este iba perdiendo humedad, en la etapa de secado -madurado.

La unidad experimental constó de 20 kg de materia prima en carne de cerdo el cual se dividió en cuatro tratamientos de 5 kg de salchicha por tratamiento. Se utilizó un total 144 salchichas que se distribuyeron en 3 tratamientos de 36 piezas cada una más el testigo o tratamiento control. Esto se detalla en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Esquema del experimento

Código	Tratamientos	Cantidad de salchichas
A	Control (sin cultivo)	36
B	<i>Lactobacillus sakei</i> (pura)	36
C	<i>Staphylococcus carnosus</i> (pura)	36
D	<i>Lactobacillus sakei</i> + <i>Staphylococcus carnosus</i> (mezcla)	36

- **Estufaje**

Se colocaron las muestras elaboradas de salchichas en una cámara de incubación a una temperatura de 28°C óptimo para el desarrollo de los microorganismos de los cultivos iniciadores empleados.

**Fermentación**

Temperatura 28° C

Humedad Relativa 85 ~ 90 %

Tiempo 3 días

**Maduración o Secado**

Temperatura 15 ~ 21° C

Humedad Relativa 70 ~ 85 %

Tiempo 18 días

- **Secado o madurado**

Durante la etapa de secado se observó como el embutido cambió su aspecto externo, debido a que perdió humedad principalmente por la diferencia del porcentaje de humedad relativa del medio (70 ~ 85%); además, del bajo pH que presentaron las muestras, que produjo que las proteínas liberen el agua propia de la

carne y que atraparon durante el proceso de elaboración. Se mantuvo al embutido en la cámara de maduración durante un período de 21 días, hasta que cumplió con características establecidas para un embutido madurado.

### 3.4.2. Elaboración de las salchichas

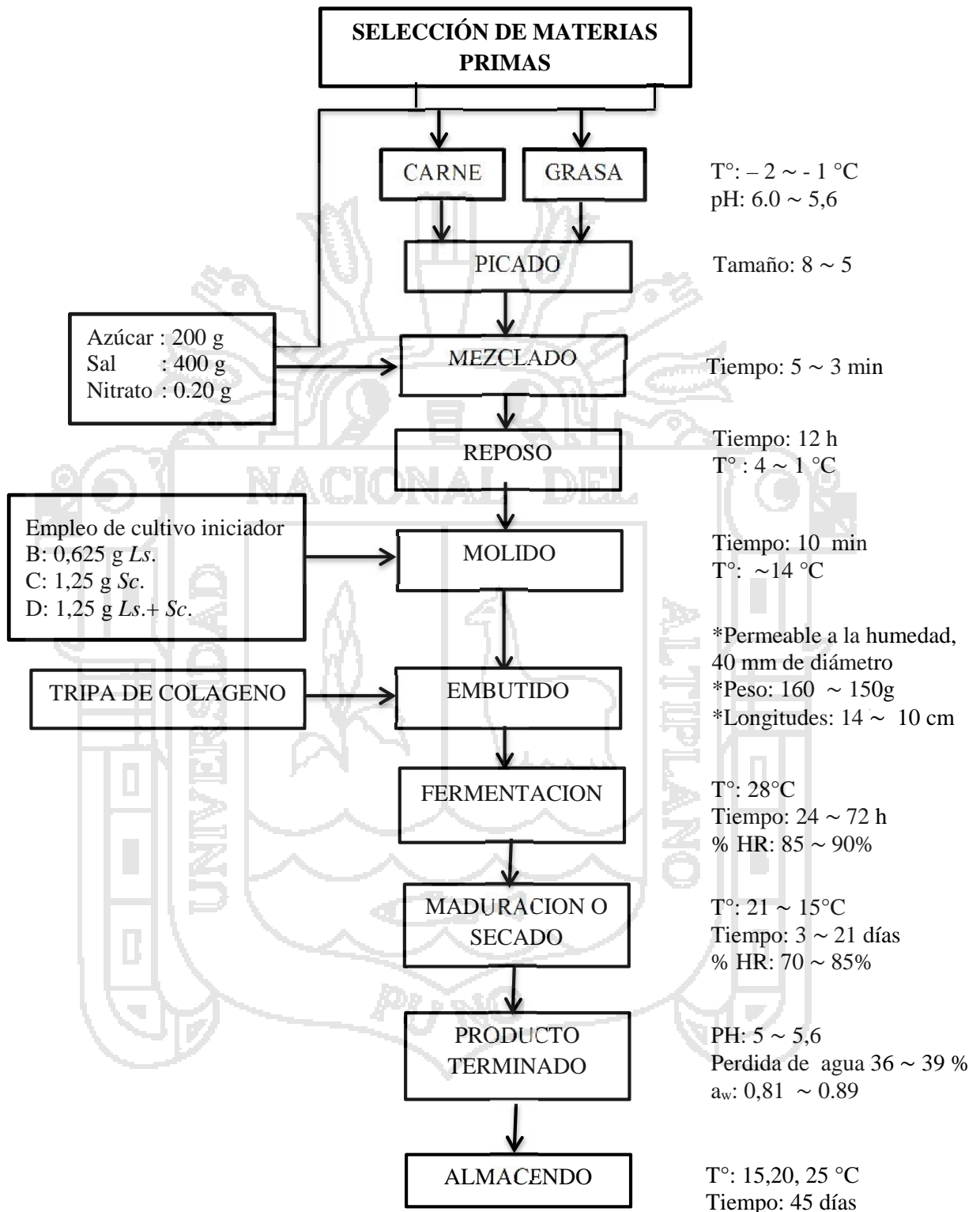
La elaboración de las salchichas se realizó siguiendo las técnicas de fabricación tradicionales con los ingredientes que se relacionan en la Tabla 6. Todos estos ingredientes fueron mezclados y amasados en una cutter y a continuación se embutieron en tripa de colágeno de 30 mm de diámetro. Se elaboraron piezas que pesaron entre 150 ~ 160 g.

**Tabla 6:** Ingredientes para la fabricación de las salchichas.

Ingredientes	Cantidad en kg	%
Carne de cerdo	17.40	87
Grasa de cerdo dura	2.0	10
Sal común	0.400	2
Azúcares	0.200	1
Sal de cura (nitrito)	0.020	0.1

**Fuente:** Adaptado a Mata,(1999) .

**Figura 3:** Diagrama de flujo de elaboración de salchichas



Fuente: Adaptado a Lücke (1998).

Para la elaboración del producto, se realizó el siguiente proceso:

- **Recepción de la materia prima:** en esta etapa se realizó recepción de la carne y de los demás ingredientes, luego se procedió a pesar los ingredientes de la formulación.
- **Deshuesado y Picado:** se separó la carne pura del hueso, se eliminaron partes de la carne que no son utilizables en el proceso como tendones y se troceó la carne y la grasa de 5 ~ 8 cm.
- **Mezclado y reposado:** de la carne y de la grasa de cerdo picadas se mezclaron con los demás ingredientes y se dejó en reposo en refrigeración por un tiempo de 12 h. (a este proceso se denomina curado), teniendo un peso total de 20 kilos de la mezcla.
- **Molido:** antes de realizar el molido, se dividió la masa cárnica en cuatro porciones iguales para los tratamientos A, B, C y D. En seguida se procedió a moler la mezcla en un molino de carnes. A continuación se realizó el mezclado; con la ayuda de la cutter para conseguir un amasado y mezclado homogéneo de la pasta. Finalmente se añadió la cantidad correspondiente de los cultivos iniciadores para los diferentes tratamientos: B, C y D considerando A como tratamiento control.
- **Embutido:** se embutió la pasta, en la embutidora Blander Stomacher, en tripas de colágeno natural de calibre 30 mm de diámetro, se cortaron en piezas que fluctuaban entre 10 ~ 14 cm de longitud.
- **Estufado o fermentado:** posteriormente las salchichas fueron transportadas a una cámara de incubación a una temperatura de 28 °C y humedad relativa de 85 ~ 90 HR% por un tiempo de 72 horas.

- **Madurado o secado:** una vez finalizada la etapa de fermentación de las salchichas, las condiciones de la cámara de incubación se variaron: a temperatura de 21°C, 85% HR por un tiempo de 6 y 15 °C, 75 % HR por 12 días.
- **Almacenado:** el almacenamiento se realizó a diferentes temperaturas (15°C, 20°C y 25 °C) por un periodo de 45 días, para predecir su tiempo de vida útil.

### 3.4.3. Factores en estudio

#### A: Cultivos iniciadores

- Control (A)
- Lactobacillus sakei (B)
- Staphylococcus carnosus (C)
- Lactobacillus Sakei + Staphylococcus carnosus (D)

#### B: Tiempos de control del procesamiento

- 0 días
- 3 días
- 6 días
- 12 días
- 21 días

### 3.4.4. Variables de respuesta

- Propiedades físicas
  - pH
  - Actividad de agua ( $a_w$ )
- Características microbiológicas

- Bacterias ácido lácticas (ufc/ml)
- Bacterias viables totales (ufc/ml)
- Coliformes totales (ufc/ml)
- Propiedades químicas
  - Intensidad de las bandas de las proteínas miofibrilares
  - Intensidad de las bandas de las proteínas sarplasmaticas
- Análisis sensorial (aceptabilidad, color, olor, sabor y textura)
- Vida útil
  - Controles microbiológicos
  - Controles de pérdida de peso

### **3.4.5 Método para el análisis físico**

#### **3.4.5.1 Determinación de pH**

La medición del pH fue realizada a los 0, 3, 6, 12 y 21 días de maduración con un pH-metro marca ORION modelo 410A (Orion Research, Boston, EUA), de acuerdo con el método reportado por Raveendran *et al.*, (1993). Se picaron 10 g de muestra, a las que se les adicionaron 90 ml de agua destilada, posteriormente se realizó un homogenizado en una licuadora doméstica a máxima velocidad, durante aproximadamente 5 minutos.

A partir de esta solución se tomaron 10 ml a los cuales se les midió el pH por introducción directa del electrodo en la misma. Cada medición se realizó por triplicado.



### 3.4.5.2 Determinación de la actividad de agua

La medición de la actividad de agua ( $a_w$ ) se realizó siguiendo el método reportado por Rodríguez, (2011) con un determinador de agua en productos Marca AQUALAB.

En una cubeta de plástico especial del equipo de medida, se depositaron 5 g de salchicha previamente picadas, en seguida se introdujo la cubeta en la cámara de medición de agua en productos, por un tiempo de 3 ~ 5 minutos. Posteriormente se procedió a realizar la lectura correspondiente del valor de actividad de agua. Cada medición se realizó por triplicado.

## 3.4.6 Método para el análisis microbiológico

### 3.4.6.1 Preparación de las muestras

En la toma de muestras para los análisis microbiológicos se ha seguido el método descrito por Pascual (1992) para embutidos crudos curados. La preparación de las diluciones decimales se realizó tomando 10 g de salchicha y con 90 ml de agua de peptona al 0.1% estéril, posteriormente se realizó un homogenizado en una licuadora doméstica a máxima velocidad, durante aproximadamente 5 minutos. A partir de ella se prepararon las sucesivas diluciones decimales seriadas en agua de peptona estéril al 0.1 %.

- Preparación de las diluciones

Las diluciones se prepararon a partir de la muestra homogenizada, tomando de ella 1 ml que se depositó en un tubo que contenía 9 ml de agua

de peptona estéril al 1%. Después de agitado el tubo, se tomó 1 ml que se añadió a un nuevo tubo con 9 ml de agua de peptona estéril y así sucesivamente, hasta conseguir la dilución deseada.

### 3.4.6.2 Preparación de los medios de cultivo

Se efectuó de acuerdo con las instrucciones de la casa suministradora del agar. Los medios de cultivo empleados en los recuentos fueron:

- a) Agar para recuento en placa (PCA). Se empleó como medio para recuento de microorganismos viables totales.
- b) Agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS). Se utilizó para el recuento de bacterias ácido lácticas.
- c) Agar VRBA (Agar con Bilis, Rojo neutro y Cristal Violeta, Oxoid CM017). Se empleó como medio para recuento de doliformes totales.

- **Siembra en placas**

De acuerdo con el número de microorganismos, se tomó 1 ml de las diluciones deseadas y se depositó en placas de Petri sembrado por profundidad. Seguidamente se vertió 10 ~ 15 ml de Agar a unos 45 °C previamente autoclavado a 112 °C por 15 minutos para cubrir el fondo de la placa; en seguida éstas se deslizaron suavemente para homogeneizar la muestra y el agar. La incubación de microorganismos se efectuó en una estufa de acuerdo a la temperatura y tiempo establecido para cada tipo de microorganismo.

Tras la incubación se realizó el recuento de las colonias presentes en las placas, considerando válidos los valores comprendidos entre 30 y 300 colonias. Los resultados finales se expresaron en (log ufc/ml) de muestra.

### **3.4.6.3 Enumeración de la flora láctica (BAL)**

El crecimiento de bacterias lácticas se evaluó cada 3 días (0, 3, 6, 12 y 21) durante el periodo de maduración en agar MRS. A partir de la serie de diluciones decimales, se depositó con una pipeta estéril 1 ml de cada dilución en placas de petri estériles de 90 mm de diámetro. A cada placa se le añadieron unos 15 ml de medio agar MRS a una temperatura de 45 °C, se mezcló cuidadosamente y se dejó solidificar, colocando las placas sobre una superficie horizontal (Método de siembra en profundidad). Una vez solidificadas las placas se introdujeron invertidas en estufa de incubación a 37 °C durante 72 h, hasta obtener crecimiento de colonias de bacterias lácticas. Los resultados se reportan como (log ufc/ml). Cada medición se realizó por duplicado.

### **3.4.6.4 Enumeración de las bacterias viables totales**

Se realizó el mismo procedimiento descrito para la flora láctica empleando el método de siembra en profundidad, adicionando una segunda capa de medio. Una vez solidificadas las placas de agar APC se introdujeron invertidas en estufa de incubación a 37 °C durante 24 h. Tras el período de incubación se efectuó el recuento de colonias viables expresando el resultado como (log ufc/ml) de muestra. Cada medición se realizó por duplicado.

#### **3.4.6.5 Enumeración de coliformes totales**

El análisis de coliformes totales se realizó el mismo procedimiento descrito para la flora láctica empleando el método de siembra en profundidad. Una vez solidificadas las placas de agar VRBA se introdujeron invertidas en estufa de incubación a 37 °C por 24 h. Tras el período de incubación se efectuó el recuento de colonias viables expresando el resultado como (log ufc/ml) de muestra. Cada medición se realizó por duplicado.

#### **3.4.7 Evaluación de los atributos sensoriales**

La estimación subjetiva de aceptabilidad y evaluación organoléptica fue realizada a los 21 días de maduración, es decir, terminado el producto. El panel de catadores consto 10 personas semi-entrenadas, de los cuales 4 fueron hombres y 6 mujeres. Las cataciones fueron realizadas en la planta piloto de carnes de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial.

La metodología para realizar estas dos evaluaciones es la descrita a continuación, la diferencia fue los formularios de evaluación. Los formularios para el estudio de aceptabilidad y el formulario para la evaluación organoléptica se pueden observar en los Anexos I y II.

#### **3.4.8 Método para el análisis de electroforesis (SDS-PAGE)**

El estudio de la degradación proteica de las salchichas fermentadas se realizó a los 0, 3 y 21 días de procesamiento.

El estudio de la degradación de proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) se detalla la metodología en el anexo III.

### 3.4.9 Método para el estudio de vida útil

El estudio de vida útil se realizó a los 0, 5, 10, 15 y 20 días de almacenamiento, considerándose como día cero, a la finalización del proceso de maduración de las salchichas (día 21). Se prepararon 15 piezas de salchichas por cada de tratamiento, sumando un total de 60 unidades de salchichas. Las muestras en estudio se mantuvieron almacenadas a temperaturas de 15, 20, 25 °C, Las mediciones consideradas para el estudio de vida útil fueron los siguientes: control de peso merma y evolución microbiológica.

#### 3.4.9.1 Control de mermas de pesos

El control de mermas se realizó efectuando pesadas periódicas a tres piezas. De salchichas de cada tratamiento, que reservaron para este fin las pesadas se realizaron. Coincidiendo con los días de control los resultados se expresaron como porcentajes de mermas referidos al peso inicial de cada pieza de salchicha.

El porcentaje de pérdida de peso (%PP) se da, principalmente, por la eliminación de agua durante el período de secado de las salchichas.

$$\% \text{ PP} = \frac{W_0 - W_i}{W_0} \times 100\%$$

Dónde:

%PP = Porcentaje de pérdida de peso

W<sub>0</sub> = Peso inicial

W<sub>i</sub> = Peso registrada

### 3.4.9.2 Pruebas microbiológica

- **Presencia de *Staphylococcus aureus***

El crecimiento de *Staphylococcus aureus* se evaluó durante el periodo de almacenamiento de las salchichas, en agar Manitol Sal. En este ensayo se empleó la técnica en siembra en profundidad. Se tomó 10 g de muestras y se procedió a licuar con 90 ml de agua peptonada estéril. Inmediatamente se realizaron las diluciones correspondientes, necesarias para la identificación de los microorganismos ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ) posteriormente se procedió a sembrar las diluciones (por duplicado) en cajas petri estériles y se vertieron de 15 a 20 ml de Agar Manitol Sal previamente temperado. Enseguida se realizó la incubación de las placas en forma invertida (tapadera hacia abajo) a 37° C por 24 ~ 48 horas. Los conteos de las colonias formadas se expresaron como ufc/ml.

- **Presencia de *Clostridium perfringens***

Por la producción de toxinas patogénicas, la identificación de *Clostridium perfringens* en embutidos madurados es importante para evitar intoxicaciones que se podrían dar por el consumo del producto contaminado. Se siguió en mismo procedimiento para *Staphylococcus aureus*, las siembras se realizaron en Agar TSC (Tryptosa Sulfito Cicloserina) por duplicado y los resultados de los conteos de colonias formadas se expresaron como ufc/ml.

### 3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la evaluación del efecto de los cultivos iniciadores en las salchichas, se aplicó una estadística básica analizando el promedio y la desviación estándar de cada parámetro evaluado. También, para determinar si existieron diferencias significativas del contenido las características físicas (pH y  $a_w$ ) y microbiológicas se realizó un análisis de varianza (ANOVA). En los casos en que las diferencias fueron significativas, las medidas se comprobaron usando el test de Duncan ( $P < 0,05$ ). Para todos estos análisis se empleó el programa informático SPSS Statistics v.20.

#### I.5.1. Evolución de la actividad de agua ( $a_w$ ), pH, y microbiología de las salchichas.

Para el presente trabajo de investigación sobre salchichas fermentadas se analizaron pruebas físicas: pH, actividad de agua ( $a_w$ ); pruebas de análisis microbiológicas: bacterias ácido lácticas, bacterias viables totales y coliformes totales. Se realizó mediante la evaluación del efecto de cultivo iniciador y tiempo durante el procesamiento para lo cual se utilizó el siguiente diseño estadístico: Diseño completamente al azar con el siguiente modelo lineal:

$$\text{Modelo estadístico lineal: } Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

$Y_{ij}$  = Es una observación en la j-ésima unidad experimental, sujeto al i-ésimo tratamiento

$\mu$  = Es el efecto medida general.

$\tau_i$  = Es el efecto del i-esimo tratamiento  $i = 1,2,3,4$

$\epsilon_{ij}$  = Efecto verdadero de la efecto  $j$ -ésima unidad experimental (replica),  
sujeta al  $i$ -ésimo tratamiento (error experimental)

### I.5.2. Característica sensorial de las salchichas

Para comparar los atributos sensoriales se aplicó un análisis de varianza en bloque, ajustado al siguiente modelo matemático.

$$Y_{ijk} = \mu + \text{tratamiento}_i + \text{catador}_j + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

$Y_{ijk}$  = Es la  $ijk$ -ésima observación,

$\mu$  = Media global

$\text{TRAT}_i$  = Efecto de la  $i$ -ésima tratamiento  $i = 1, 2, 3, 4$

$\text{Catador}_j$  = Efecto del  $j$ -ésimo bloque (catador)  $j = 1, 2, 3, \dots, 10$

$\epsilon_{ij}$  = Componentes aleatorios del error.

### I.5.3. Determinación de la vida útil de las salchichas

Para determinar la vida útil del producto se utilizó el modelo de reacción cinética basado en la ecuación de Arrhenius, (reacción de orden cero) controlando cambios de la concentración de algunos componentes como el porcentaje de pérdida de peso, evolución microbiana, el modelo aplicado a la determinación de vida útil de las salchichas es el siguiente.

Cálculo velocidad constante de deterioro, utilizando la siguiente fórmula:

$$t_u = \frac{Q_0 - Q_f}{k}$$



$Q_f$  = Concentración final del factor al tiempo  $t$ .

$Q_0$  = Concentración inicial del factor al tiempo 0.

$t$  = Tiempo de estabilidad (días).

$k$  = Constante de velocidad a la temperatura estudiada.



## II. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1. PARAMETROS FÍSICOS

#### 4.1.1. Evolución del pH

En la Figura 4 se muestra la evolución del pH a lo largo del proceso de maduración de las salchichas desde los días 0 ~ 21 y en el anexo IV muestra los resultados de valores medios y la desviación estándar.

Como se observa en la Figura 4, durante la fase de fermentación comprendidas entre los días 0 a 3 se produce un descenso del pH, que es más acusado en las salchichas del tratamiento D, registrando valores medios de (6,03 a 5,50) mostrando un descenso aproximado de cinco unidades de pH, seguido por el tratamiento B con una disminución de tres unidades de pH aproximadamente. Los valores de pH que registran el tratamiento C y A, fueron diferentes de los observados del resto, muestran una caída de pH más lenta. Esta caída de pH de acuerdo con lo reportado por Stiles, (1996) y Schillinger *et, al.*, (1996) durante la fermentación de las salchichas es ocasionada por la acción de bacterias lácticas sobre los azúcares con consecuente producción de ácido láctico.

Por otra parte, en las etapas iniciales e intermedias de la maduración aún continúa el descenso del pH en los tratamientos D, B y C hasta los días 12 de maduración, en este momento se alcanzan los mínimos valores de pH en todos los tratamientos excepto el control.

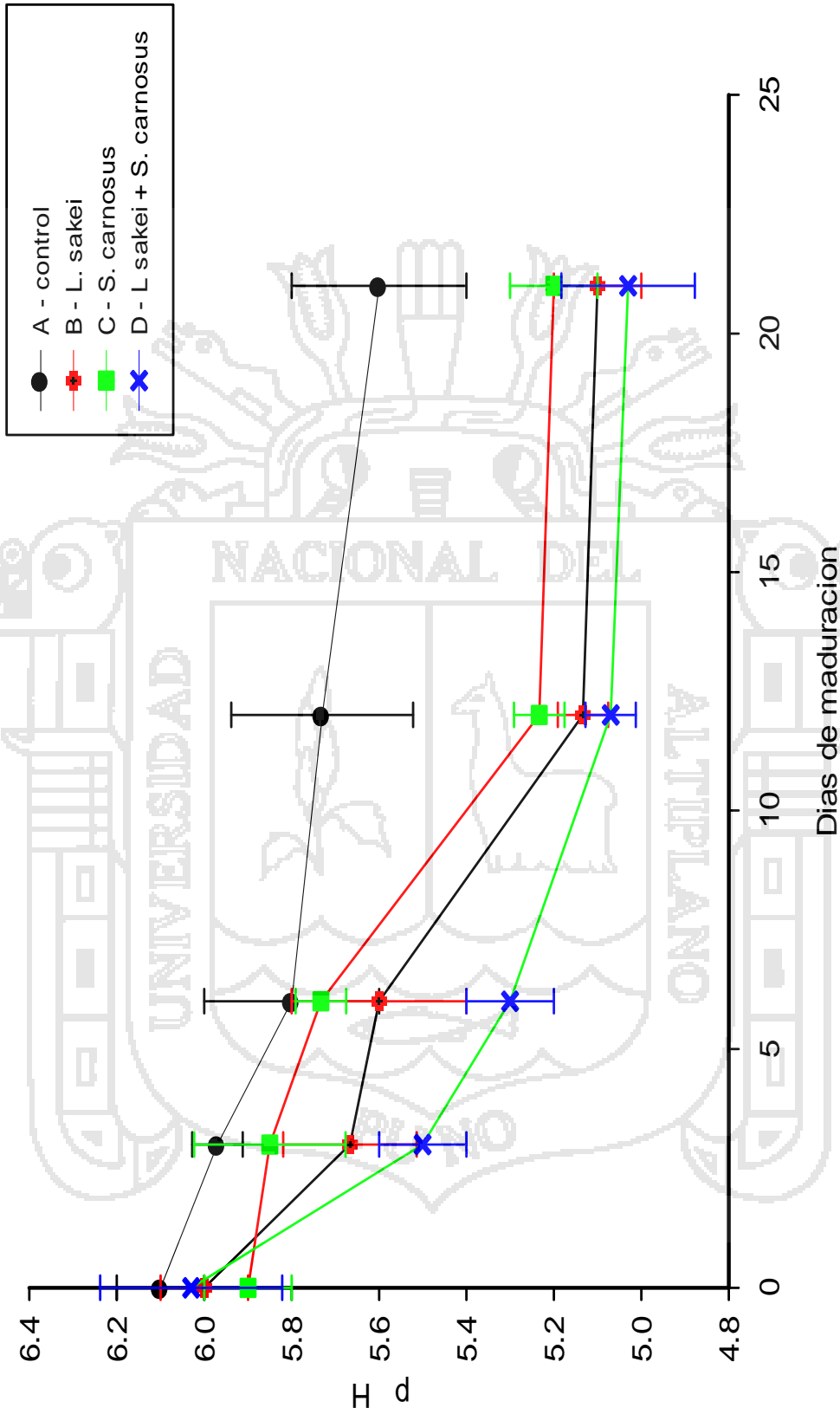


Fig. 4: Evolución del pH en las salchichas fermentadas analizadas durante la maduración.

Este valor mínimo puede interpretarse como el momento en el cual cesa la liberación de protones y en nuestro estudio osciló entre 5,13 para los tratamientos D y B, seguida por el tratamiento C con una media de 5,23 y de 5,73 para el control como se muestra en el (anexo IV) posteriormente se produce cierta estabilidad, hasta el final.

El análisis de varianza que se realizó entre las distintas etapas de maduración son significativas ( $p < 0,05$ ) partir del día 3 al parecer muestra efecto los cultivos iniciadores sobre la respuesta experimental del pH.

Se realizó la prueba de Duncan al 5% de significancia las comparaciones se muestran que todos los tratamientos presentan diferencias, se establece que cualquier cultivo iniciador empleado se obtendrá diferencia entre los valores de pH. El descenso de pH también se refleja en el desarrollo de la flora Gram negativo (coliformes), que disminuyó a medida que se reduce el pH, algunos autores afirman que la Gram negativo puede llegar a desaparecer inhibida por el descenso del pH y por el predominio de la flora láctica.

Los resultados obtenidos pudieron explicarse basándose en que los factores como temperatura y humedad relativa controladas pudieron enmascarar el efecto del pH en las distintas etapas del proceso.

Por otro lado, los valores observados para el pH al final del proceso se muestran coincidentes con los señalados por distintos autores para embutidos similares (Sanz, *et al.*, 1997b) aunque son ligeramente superiores a los determinados por otros autores que han señalado valores de pH final inferiores a

5,0 en productos elaborados y madurados en condiciones similares a las mostradas en este trabajo (Bello y Sánchez, 1997).

#### 4.1.2. Evolución de la actividad de agua ( $a_w$ )

La actividad de  $a_w$  es uno de los factores más relevantes para la multiplicación microbiana y consecuente para la estabilidad de los alimentos. En la Figura 5 se presenta la evolución de estos valores a lo largo del proceso de maduración de los embutidos y en el (anexo V) muestra los valores medios y desviación estándar.

La  $a_w$  fue descendiendo paulatinamente a lo largo del proceso madurativo como era de esperar desde valores inicial promedio de 0,9652 hasta 0.8197 para el tratamiento D y 0.9668 a 0.8389 para el B. Las salchichas del tratamiento C presentaron valores comprendidos entre 0,9599 hasta 0,8495, el tratamiento A (control) presentó un  $a_w$  de agua final de 0,8914. Como se puede apreciar en la figura 5, todas las salchichas mostraron una evolución lineal descendiente con excepción de la muestra control.

Mediante el análisis de varianza de los valores de  $a_w$  no se aprecian diferencias entre los distintos tratamientos ( $p > 0,05$ ) a pesar que en la etapa de maduración descendió los valores de  $a_w$ .

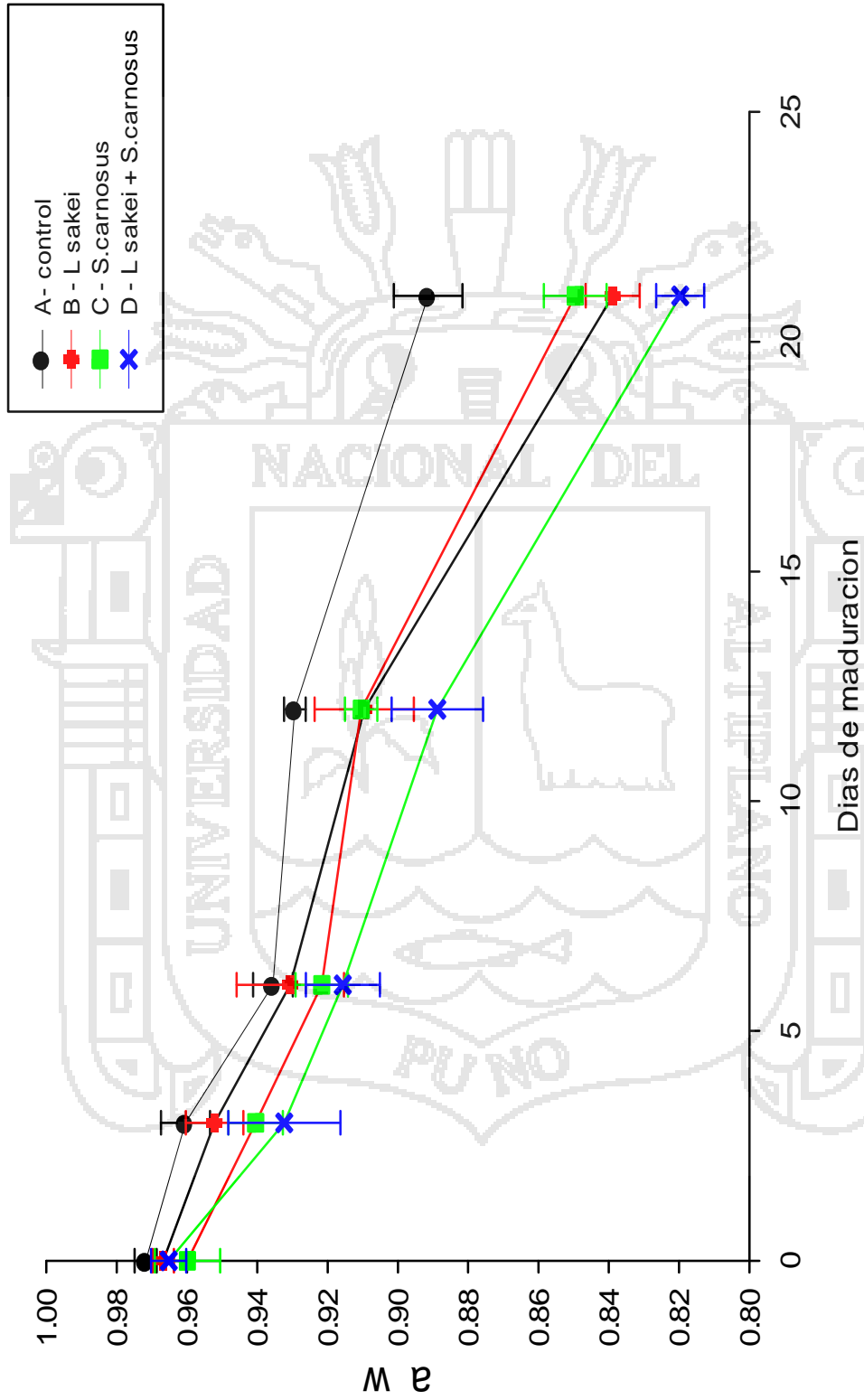


Fig. 5: Evolución de  $a_w$  en las salchichas fermentadas analizadas durante la maduración.

Los resultados finales obtenidos de la maduración son muy similares a los rangos referidos por Rojas *et al.*, (1991), para embutidos fermentados que oscilan entre 0,83 ~ 0,96 con una media de 0,91. Pueden considerarse estas salchichas como alimento de humedad intermedia (AHÍ). Esto confirma que la reducción de la  $a_w$  inhibe el crecimiento de la microflora Gram negativa responsable de numerosos defectos en embutidos, a su vez la inhibición de estos microorganismos favorece el desarrollo de la flora beneficiosa responsable de la maduración: *micrococáceas* y *bacterias ácido lácticas*. En nuestro caso se ha observado una relación directa entre la  $a_w$  y el recuento de *coliformes*, al no reportar su presencia, esto confirma que la reducción de la  $a_w$  de agua inhibe el crecimiento de la microflora Gram negativa.

Como se ha mencionado anteriormente, la  $a_w$  es uno más de los factores u obstáculos que participan en la estabilidad microbiológica de los productos crudos curados y que tiene mayor repercusión a medida que avanza el proceso de maduración. Sin embargo Mata (1999), establecieron un límite de 0,91 de  $a_w$  para inhibir a todos los patógenos excepto *staphylococcus aureus*, en condiciones de aerobios.

## 4.2. EVOLUCIÓN DE LOS RECuentOS MICROBIOLÓGICOS

### 4.2.1. Flora láctica

El recuento de la flora láctica se realizó mediante la siembra en agar MRS, a los 0, 3, 6, 12 y 21 días de maduración. Los valores medios de BAL (expresados como log ufc/ml) en la Figura 6 se presenta la evolución de estos valores a lo largo de la maduración de las salchichas y las desviaciones estándar de los diferentes

tratamientos analizadas se muestran en el anexo VI, Como se pueden observar los recuentos iniciales fueron más elevados en los embutidos empleados con cultivos iniciadores, que mostraron valores de 6,93 y 6,96 para los tratamientos D y B, respectivamente. Estos recuentos fueron casi dos unidades logarítmicas más elevadas que el determinado en las salchichas sin empleo de cultivo tratamiento A donde se determinó un valor de 5,30 log ufc/ml. Las salchichas empleadas con *S. carnosus* del tratamiento C mostro un valor intermedio, con recuentos de 5,97. Esta diferencia puede atribuirse a la adición de células viables que se realiza cuando se utiliza cultivos iniciadores. Numerosos investigadores han comprobado que la adición de cultivos iniciadores incrementa los recuentos iniciales de las bacterias lácticas, (Mata, 1999, Hugas *et al.*, 1993 y Leistner, 1995). En el caso de *S. carnosus* tratamiento C no se observa un incremento considerable ya que este no aporta células viables a la masa cárnica, puesto que como se ha definido anteriormente este producto contribuye a formación estabilidad del color y aroma.

Durante la fase de fermentación las salchichas de los tratamientos B y D experimentaron un aumento que les llevo a obtener valores de 8,46 y 8,93 log ufc/ml respectivamente. Estos recuentos permanecieron prácticamente constantes durante los días de maduración hasta el final del proceso donde determinaron recuentos de 8,46 y 8,98 log ufc/ml. Las salchichas empleadas con *S. carnosus* del tratamiento C y el control A, a comparación de los demás se observa un ligero incremento en etapa de fermentación obteniendo valores de 6,61 y 6,52 log ufc/ml respectivamente. Estos recuentos experimentaron ligeras oscilaciones en el transcurso de la maduración para el final mostrando unos valores de 7,82 (tratamiento C) y 7,22 (tratamiento A) log ufc/ml.



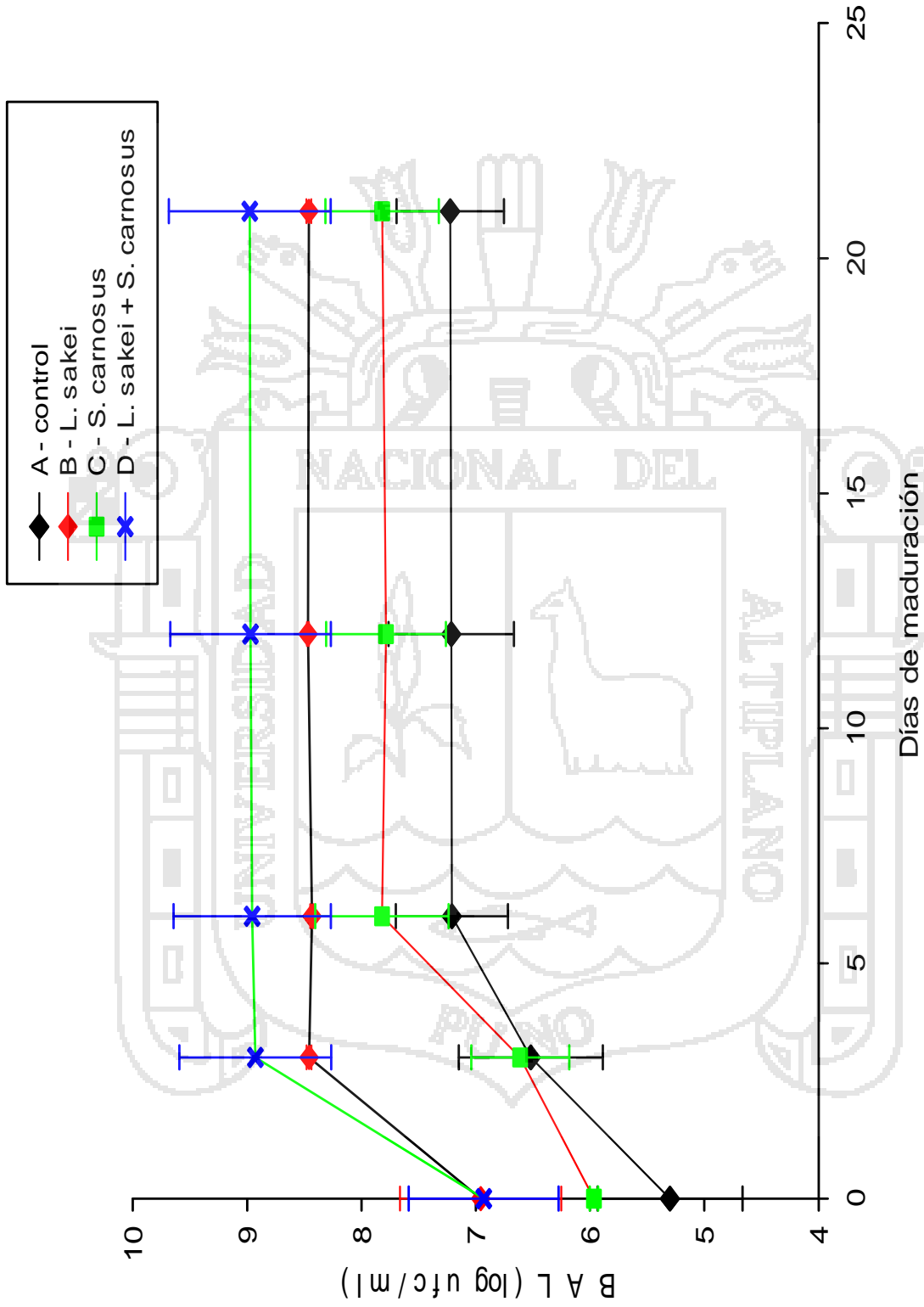


Fig. 6: Evolución del recuento de bacterias ácido lácticas en las salchichas fermentadas analizadas durante la maduración

Las diferencias observadas entre las salchichas empleadas con cultivos iniciadores fueron estadísticamente significativas ( $P < 0,005$ ). Por otro lado, las salchichas sin cultivo (tratamiento A) mostraron los recuentos de bacterias lácticas más bajos, estableciendo también diferencias significativas con el resto de tratamientos. Con respecto a la evolución sea comprobado que los recuentos obtenidos durante la etapa inicial de fermentación para todos los tratamientos fueron significativamente ( $P > 0,005$ ) observándose estas diferencias significativas hasta el final del proceso.

El predominio de las lactobacilos en las salchichas a los que no se ha adicionado cultivo iniciador ha sido previamente descrito por numerosos autores (Mata, 1999 y Díaz, 1994b). Este predominio confirma el hecho de que bajo unas condiciones de maduración adecuada y con unas buenas prácticas de fabricación (BPF) se pueden producir salchichas de excelente calidad.

No obstante, (Fadda *et al.*, 2008) afirma que los *lactobacilos* son el género que predomina de forma natural en este tipo de productos y en carnes envasadas al vacío, por tanto, las cepas aisladas de estos productos que se utilizan como cultivos iniciadores, están mejor adaptadas y se desarrollan más.

En nuestro estudio los embutidos inoculados con cultivos iniciadores (tratamientos D y B) obtuvieron los recuentos más elevados tras la fermentación, próximos a 9 log ufc/ml mientras que el resto de tratamientos no excedió el valor de 8 log ufc/ml. Además los embutidos de los tratamientos D y B alcanzaron los recuentos máximos en la fermentación, en tanto que los otros embutidos no lo

consiguieron hasta final del proceso. Recuentos similares fueron determinados por Montel *et al.* (1993) en embutidos inoculados con *L. sake* y *S. carnosus* fue capaz de dirigir la fermentación y se instauró como microorganismo predominante.

Estos resultados podrían ser explicados en base a que el uso de cultivos iniciadores en la elaboración de este tipo de productos provee a las mismas de un número suficiente de microorganismos como ocurre en los tratamientos B y D que asegura numéricamente el dominio de ellos sobre el resto de la flora acompañante este hecho acelera el proceso de fermentación que junto al uso de una temperatura adecuada asegura una fermentación rápida de modo de que un ambiente ácido en el producto constituye un mecanismo de control de bacterias indeseables.

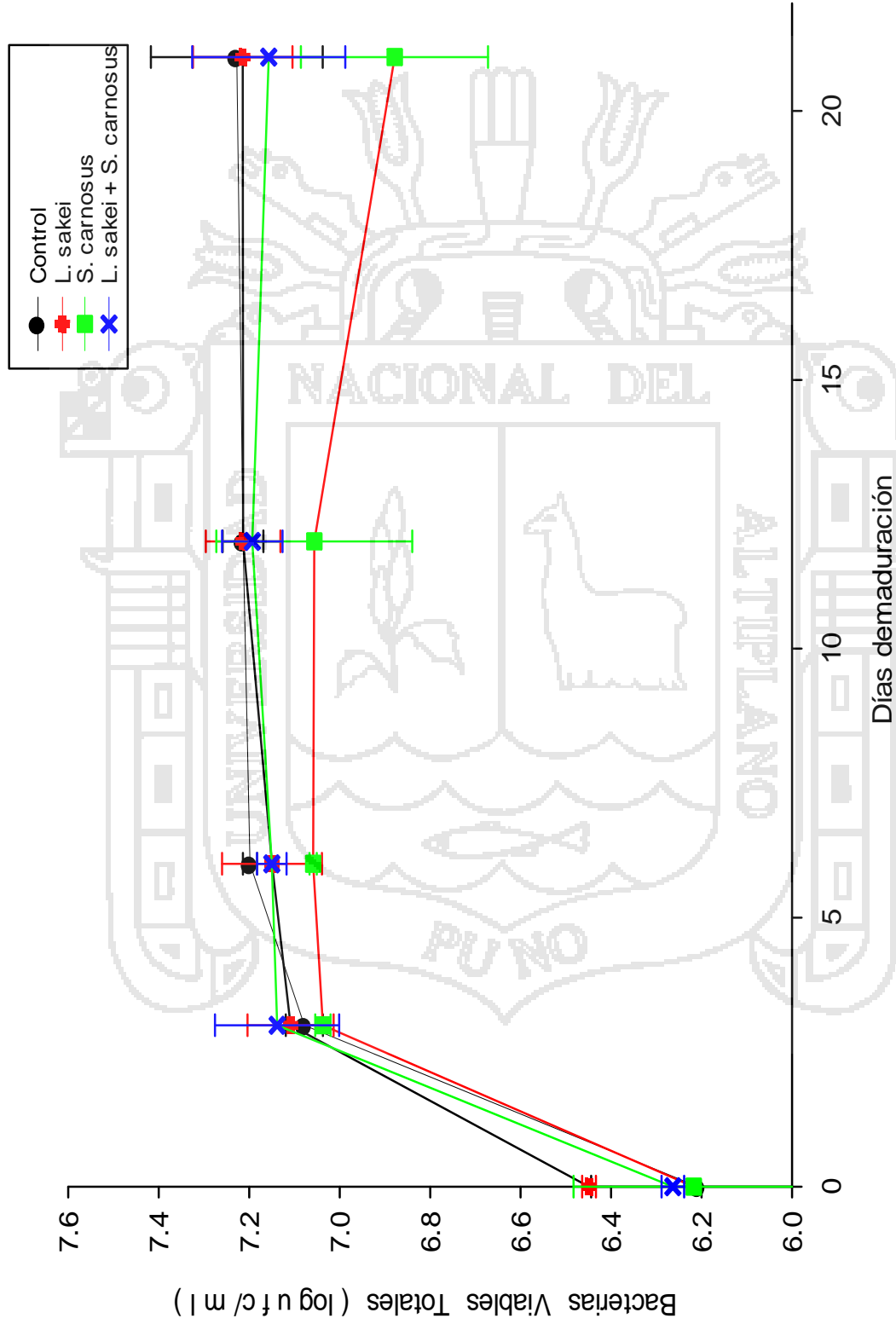
#### **4.2.2. Recuento de bacterias viables totales**

La evolución de dichos recuentos se representa esquemáticamente en la Figura 7. Como puede apreciarse la evolución es similar para todos los tratamientos de las salchichas. Durante la fermentación se produce un considerable incremento de los valores iniciales posteriormente se mantienen constantes durante el resto de la maduración ó bien descienden ligeramente en los últimos estadios y en el anexo VII, se muestran los valores medios y las desviaciones estándar de los recuentos de bacterias viables totales (expresado como log ufc/ml) de los distintos tratamientos de salchichas analizados a lo largo de la maduración.

Partiendo de valores iniciales de bacterias viables totales comprendidos entre 6,51 y 6,69 log ufc/ml, tras la fermentación se produce un incremento de los recuentos que varía dependiendo del tratamiento. Los salchichas inoculados con

cultivo iniciadores (tratamiento D) experimentaron un aumento alcanzando recuentos de 6,77 log ufc/ml. Recuentos similares mostraron los salchichas de (tratamiento C), que con un incremento alcanzaron un valor de 6,74 log ufc/ml. Estos recuentos fueron los máximos obtenidos tras fase de fermentación.

Durante los primeros estadios de la maduración el recuento total de las salchichas del tratamiento D siguió aumentando ligeramente hasta alcanzar un máximo en el día 6 con un valor de 6.84 log ufc/ml, el cual volvió a descender en los siguientes días hasta un valor final de 6.80 log ufc/ml. Las salchichas del (tratamiento A), en cambio, mantuvieron constante el valor alcanzando en la fermentación, durante la maduración y se incrementó ligeramente al final, alcanzando un valor de 6,81 log ufc/ml. Finalmente las salchichas de los tratamiento (B y C), experimentaron el menor incremento de todos, permitió obtener un recuento de 6,71 y 6,74 log ufc/ml. Este valor continuó aumentando hasta alcanzar el valor máximo en el día 21 (6.78 y 6,67 log ufc/ml) última etapa de la maduración. Estas diferencias pueden ser debidas a la tecnología de fabricación empleada, concretamente al tiempo que permanece la masa



**Fig. 7:** Evolución del recuento de bacterias viables totales en las salchichas fermentadas analizadas durante la maduración.

cárnica en reposo antes del embutido. El análisis de varianza no detectó diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre los recuentos en la fase de fermentación y en las demás etapas del proceso.

En cuanto a la evolución durante la fermentación, distintos autores coinciden en señalar que se produce un incremento considerable de la flora inicial hasta valores próximos a 8 log ufc/ml (Mata, 1999 y Martin, 2005). En embutidos madurados naturalmente, sin adición de aditivos lácticos, Samelis *et al.* (1994) señalaron que durante la fermentación se producía un incremento del recuento total del 14 %, hasta valores de 7,32 ~ 7,77 log ufc/ml. Estas diferencias en los recuentos también se observaron en nuestro estudio, estableciéndose una diferencia de casi una unidad logarítmica entre los recuentos de los tratamientos A y D. No obstante estas diferencias pueden llegar a ser incluso superiores a 5 unidades logarítmicas entre los recuentos microbianos de embutidos adicionados de cultivos iniciadores de bacterias lácticas y los recuentos de embutidos sin inocular (García *et al.*, 1992)

En cuanto al resto del proceso, los recuentos se mantienen prácticamente constantes, aunque pueden existir ligeras oscilaciones de aumento o descenso. Los valores máximos se determinaron en casi todos los casos entre los días 3 y 6 de maduración, para luego descender ligeramente, excepto en las salchichas sin inóculo de cultivo iniciador (tratamiento A), donde el máximo valor se determinó el día 21 de maduración. En general, en la mayoría de los trabajos consultados los valores máximos se alcanzan tras la fermentación, y a partir de ese momento, bien

descienden ligeramente (Ordóñez *et al.*, 1995; Sanz *et al.*, 1997b) o permanecen constantes hasta el final del proceso.

#### 4.2.3. Coliformes totales

La presencia de esta bacteria es identificación de un inadecuado control, tanto en materias primas, equipos y del personal, ya que es común encontrarla en el grupo de coliformes fecales. En la Tabla 7 se muestra los valores medios y desviaciones obtenidos en el conteo de coliformes totales, que se expresan como (log ufc/ml).

**Tabla 7:** Valores medios y desviación estándar de los recuentos de bacterias coliformes (log ufc/ml muestra).

Trat.	Tiempo (días)		
	0	3	6
A- control	4,01 ± 0,35 a	1,87 ± 2,64 a	ND
B- <i>L.sakei</i>	4,10 ± 0,37 a	ND	ND
C- <i>S.carnosus</i>	4,20 ± 0,33 a	ND	ND
D - <i>Ls + Sc</i>	3,76 ± 0,26 a	ND	ND

Dónde: ND = no determinado

Como puede observarse en la Tabla 7 los recuentos iniciales fueron muy similares para todos los tratamientos de las salchichas, oscilando entre 4,01 y 3,76 log ufc/ml, y es durante etapa de fermentación cuando comienzan a establecerse las diferencias. En esta etapa de se observa la descenso total de la evolución de bacterias coliformes. Esta ausencia puede ser debida al predominio de los *lactobacillus* creando un el medio acido, y con ella alcanzándose un bajo pH que evita el crecimiento de las bacterias indeseables.

Sin embargo la ausencia de coliformes no asegura la ausencia de patógenos entéricos, por lo que para determinar la vida útil se realizaron pruebas microbiológicas de patógenos.

### 4.3. EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES

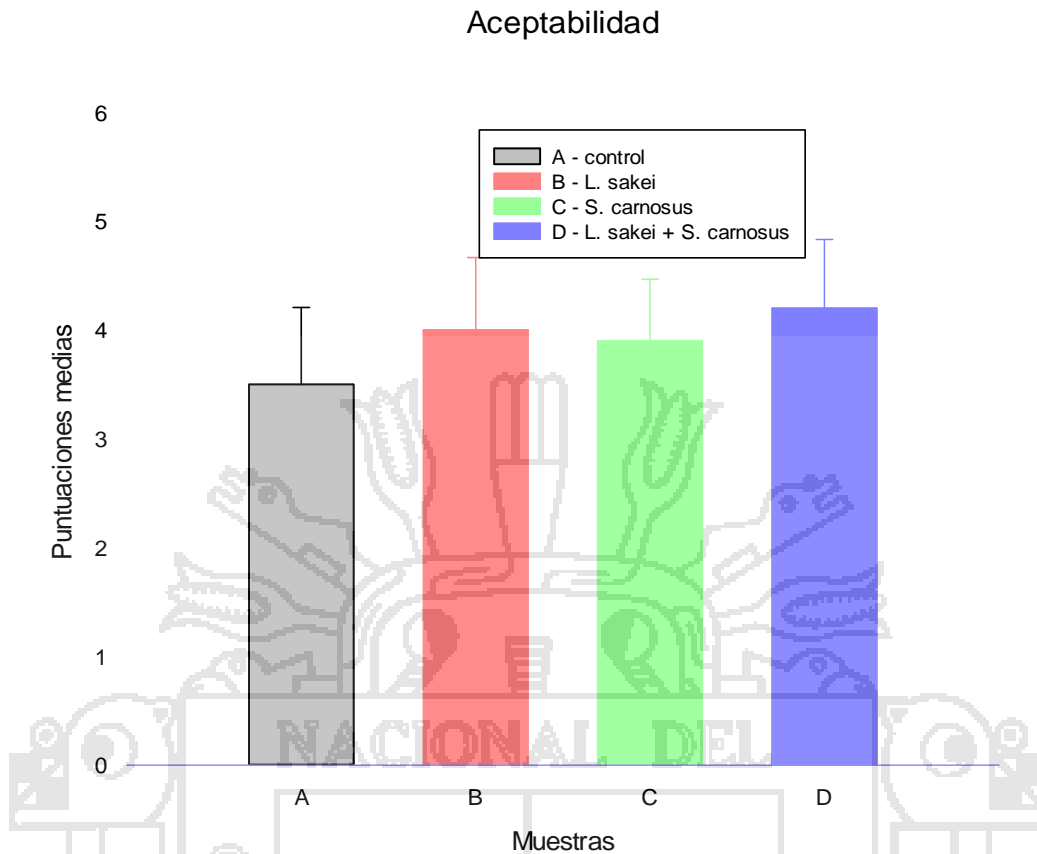
En el anexo VIII se muestran las puntuaciones medias y las desviaciones estándar obtenidas para cada atributo sensorial en los diferentes tratamientos de salchichas analizados al final del proceso (día 21). A continuación se exponen los distintos atributos sensoriales.

#### 4.3.1. Aceptabilidad

La aceptación del consumidor hacia las salchichas se evaluó basándose en las características del color, olor, sabor y textura, utilizando una escala hedónica de 5 puntos con los siguientes descriptores: me disgusta mucho = 1, me gusta = 2, es indiferente = 3, me agrada = 4 y me agrada mucho = 5.

Como se puede apreciar en la Figura 8, se percibe de forma evidente que los catadores mostraron preferencias por las salchichas de los tratamientos D y B, que obtuvieron una puntuación de 4,2 y 4,0. El resto de los tratamientos presentaron puntuaciones de 3,9 para C y 3,5 para el control A. Estas diferencias, sin embargo no fueron significativas ( $P > 0,05$ ), dicha aceptabilidad determinada se debe principalmente a que el consumo de embutidos madurados, no es muy difundido. Pero en general se establece que el producto elaborado tubo un adecuado porcentaje de aceptabilidad por parte de los panelistas.





**Fig.8:** Promedio de las puntuaciones medias de las salchichas, atributo: aceptabilidad

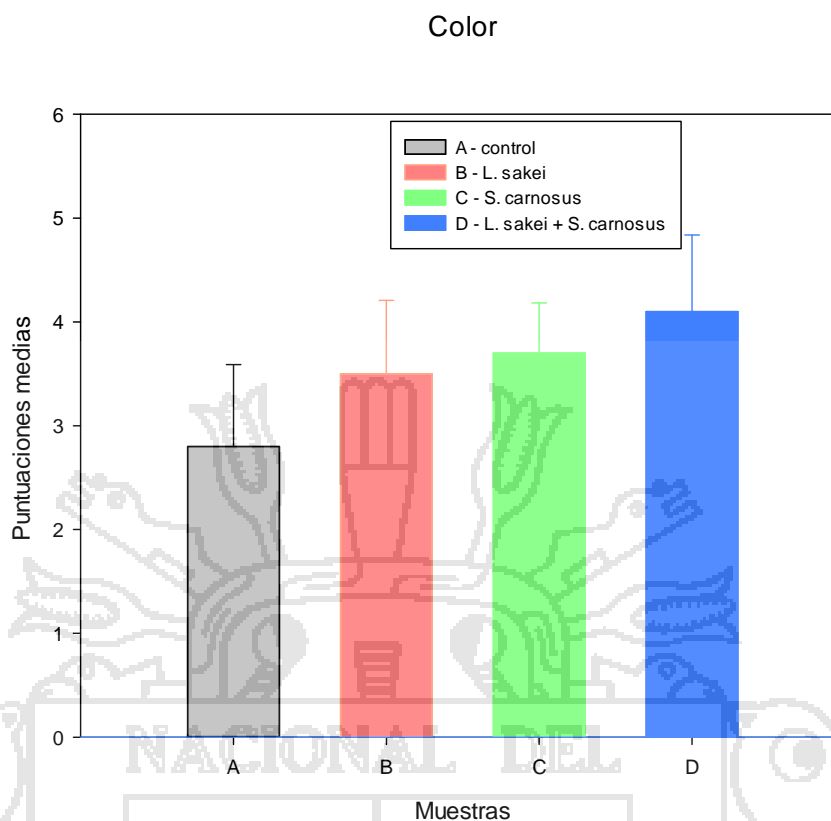
Estos resultados son coincidentes con los observados por Mata (1999) que en un estudio con embutidos, empleados con fermentos lácticos, observaron que no existe diferencia entre los embutidos empleados con cultivos iniciadores y sin cultivo. A si mismo Rodríguez (2011) evaluó el efecto de microorganismos probióticos empleados a productos cárnicos tipo salami, observo que no existen diferencias en la aceptación de los tratamientos que percibieron los catadores. Por otro lado, González- Fernández *et al.* (1997) han comprobado que la adición de lactobacilos a embutidos mejora las cualidades sensoriales de éstos, mostrando una mayor aceptabilidad general con respecto a los embutidos control. Resultados similares fueron obtenidos por Garriga *et al.* (1996) que observaron cómo

embutidos no adicionados de cultivos lácticos sufrían un deterioro importante de su aceptabilidad general debido a la aparición de olores pútridos como consecuencia del metabolismo de las *enterobacterias*. En cambio en los embutidos inoculados se estableció la flora láctica que predominó con respecto a las bacterias Gram negativas, evitando la presencia de defectos que deprecien su aceptación global.

#### 4.3.2. Color

Para el análisis del atributo color de las muestras de salchicha se utilizó una escala hedónica que evaluó la intensidad del color rojo característico en embutidos madurados. La escala estuvo planteada desde “Nada Intenso” con una valoración de 1 a “Muy Intenso” con un valoración de 5, como se muestra en el anexo II.

La intensidad de color, como se muestra en la Figura 9, fue mayor en los las salchichas del tratamiento (D) donde se alcanzaron las puntuaciones máximas de 4,1 y menor en los en las salchichas sin cultivo iniciador tratamiento (A) que mostraron una puntuación de 2,8. Los tratamientos C y B alcanzaron puntuaciones de 3,7 y 3,5. Estas diferencias de color observadas entre los distintos tratamientos fueron estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ), lo cual podría atribuirse que el tipo de cultivo empleado tuvo efecto sobre color del producto final. Estas calificaciones indican que la apreciación de los catadores hacia el color de las muestras de salchicha es de un color rojo madurado distintivo a este tipo de productos.



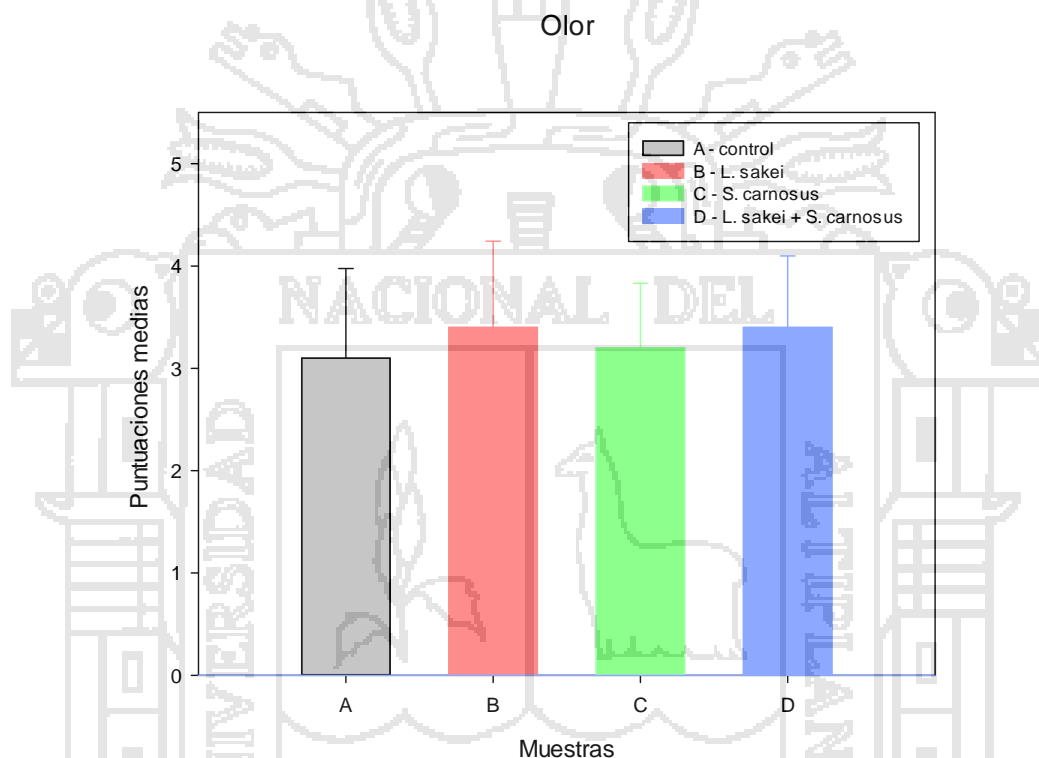
**Fig. 9:** Promedio de las puntuaciones medias de las salchichas atributo: color

Estos resultados alcanzados posiblemente se puedan deber, según a lo reportado por Carrascosa y Cornejo, (1991) a la actividad nitrato reductasa de los cultivos iniciadores empleadas, lo cual reduce el nitrato en nitrito durante el periodo de fermentación y posteriormente en óxido nítrico que reaccionan con la mioglobina para formar la nitrosilmioglobina o pigmento rojo del curado gracias a la actividad de las *micrococaceas*.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Rodríguez (2011), que observo diferencias en el color entre los embutidos empleados con microorganismos prebióticos y el control sin empleo de microorganismo. Así mismo Minor (1999) observo un cambio significativo del color en las muestras de carne fermentada con *Staphylococcus carnosus* y *Lactobacillus alimentarius* almacenadas a 19 °C

### 4.3.3. Olor

Los productos cárnicos madurados adquieren su olor característico durante el proceso de maduración donde por reacciones bioquímicas se liberan compuestos aromáticos. En la escala hedónica propuesta para el atributo olor, se ubican apreciaciones desde “Nada Perceptible” con una valoración de 1 a “Muy Perceptible” con una valoración de 5.



**Fig. 10:** Promedio de las puntuaciones medias de las salchichas atributo: olor

En la Figura 10 se observa que los tratamientos A y C obtuvieron similares puntuaciones mostraron valores de 3,1 y 3,2 respectivamente. Por otro lado los tratamientos B y D obtuvieron calificaciones iguales mostrando un valor de 3,4. Sin embargo en el análisis estadístico realizado no se observaron diferencias significativas percibidas por los catadores entre los tratamientos ( $P > 0,05$ ). Lo cual coincide con los resultados observados por Mata (1999), que no obtuvieron diferencias en la evaluación del olor entre embutidos empleados con fermentos lácticos. También Garriga *et al.* (1996), en un estudio comparativo con diferentes

cepas de bacterias lácticas, comprobaron que los embutidos inoculados con *Lactobacillus sake* CTC 284, *Lactobacillus curvatus* CTC 371 y *Lactobacillus plantarum* CTC 305 mostraron un olor más intenso que los embutidos sin inocular o inoculados con otras cepas de las mismas especies.

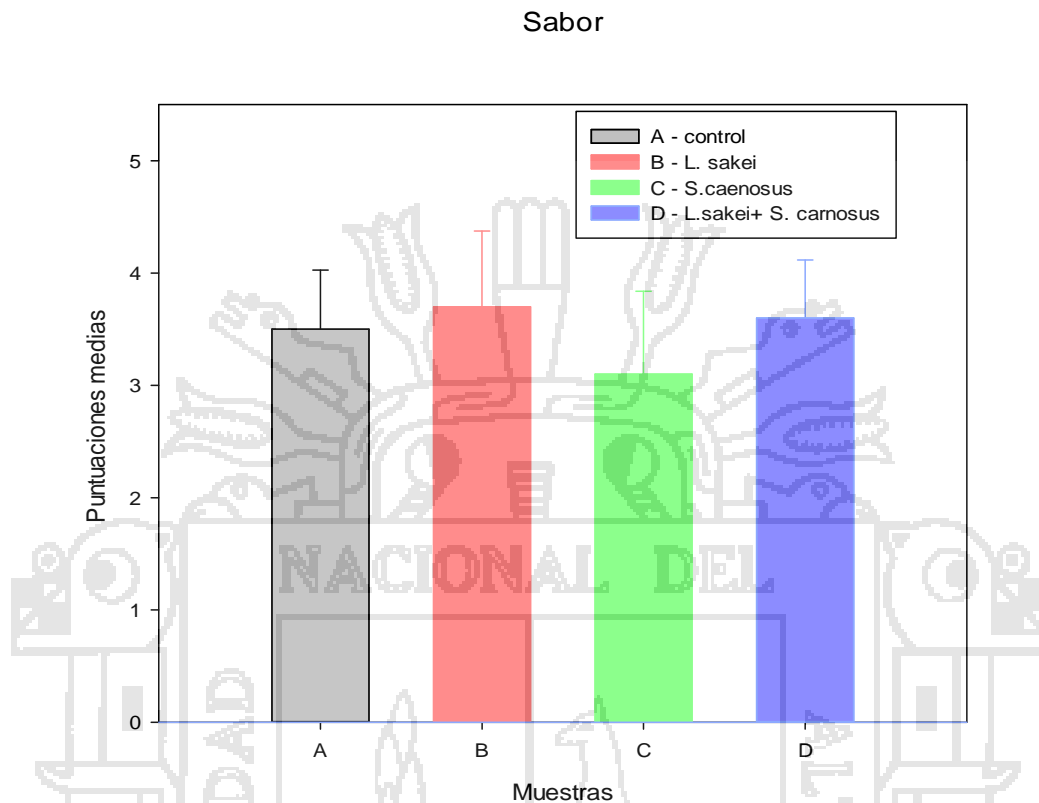
Esta característica percibida por los catadores posiblemente podría deberse según señalado por Mata (1999), a la rapidez e intensidad del descenso de pH durante la fermentación de los embutidos va a estar muy relacionada con el posterior proceso de desecación y pérdida de agua, lo cual va a afectar a atributos como la facilidad de separación de la tripa, dureza y jugosidad. Asimismo, el aroma de los embutidos depende en gran parte de cómo se produzca el descenso del pH; si tenemos en cuenta ambos aspectos, se podría explicar la relación entre la intensidad de olor y los atributos dependientes de la cantidad de agua del producto, como son la facilidad de separación de la tripa y la jugosidad.

#### 4.3.4. Sabor

La escala hedónica planteada para el atributo sabor estuvo dada desde “extraño” con una valoración de 1 a “picante” con una valoración de 5. Se tuvo en cuenta que el sabor de los productos cárnicos madurados es una combinación de sabores (salado, ácido y picante).

La Figura 11 muestra las puntuaciones medias para las calificaciones del sabor otorgadas por los panelistas que van desde los valores de 3,7 a 3,6 (poco acida – acida) para el tratamiento B y C, seguido por el tratamiento control A presentando un valor de 3,5 y para el tratamiento C con una puntuación de 3,1 respectivamente. Pese a estas diferencias, el análisis estadístico demostró que no

eran significativas ( $P > 0,05$ ) por lo que se puede afirmar que el empleo de un tipo u otro cultivo iniciador a las salchichas no afecto en la percepción final del sabor.



**Fig. 11:** Promedio de las puntuaciones medias de las salchichas atributo: sabor

Estos resultados coinciden con los observados por Mata, (1999) y Rodríguez, (2011) que tampoco encontraron diferencias entre el sabor de embutidos inoculados con fermentos lácticos y los embutidos del control. No obstante, otros autores han podido constatar un incremento en la intensidad del sabor cuando se inoculaban cultivos iniciadores a embutidos, especialmente cuando se trataba de lactobacilos Martín (2005).

En los embutidos crudos curados el sabor ácido está producido en gran medida por la presencia de los productos de la fermentación (ácido láctico y ácido acético), aunque también pueden participar aminoácidos, como: el ácido aspártico,

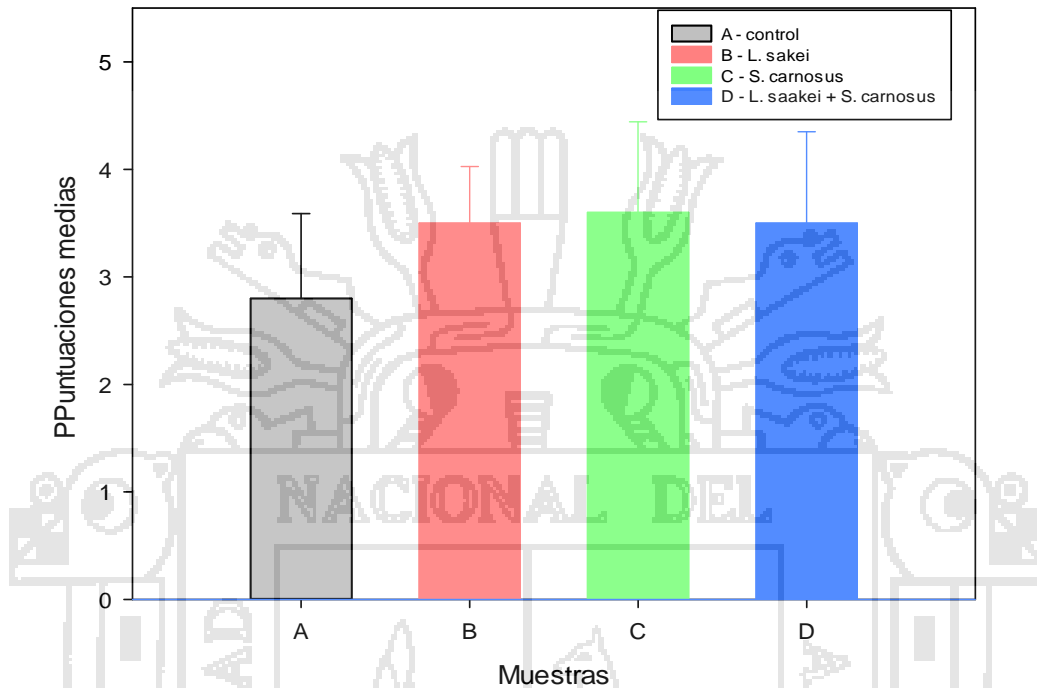
el ácido glutámico, la L-histidina y la L-asparagina Mata, (1999). Otros autores también han apuntado la contribución de determinados compuestos volátiles (alcohol, acetonas, aldehidos y furanos) y no volátiles (aminoácidos, péptidos, azúcares y nucleótidos) procedentes de las materias primas o generados a partir de las reacciones bioquímicas (proteólisis) que suceden durante la maduración (Toldrá, 1998b).

La utilización de cultivos iniciadores de bacterias lácticas en la elaboración de este tipo de productos suele originar un incremento del sabor ácido, tal y como ha sido descrito por (Díaz, 1994b). Esta acentuación del sabor ácido está asociada generalmente a un incremento del contenido de ácido láctico en el producto, aunque en ocasiones la concentración de estos ácidos puede ser muy elevada y originar embutidos con un sabor inaceptable Toldrá, (1998b). No obstante, en algunos países del norte de Europa y en Norteamérica, los consumidores tienen preferencia por un tipo de embutidos poco curados y de sabor más ácido, que no predomina en los embutidos de maduración lenta más propios de la cuenca mediterránea (Díaz, 1994b).

#### **4.3.5. Textura**

Durante la etapa de secado de las salchichas, perdió humedad, por ende adquiere una textura adecuada y característica de este tipo de embutidos. La escala hedónica propuesta para el análisis de la textura fue propuesta desde “Muy blanda” con una valoración de 1 a “Muy dura” con una valoración de 5. Las puntuaciones medias otorgadas por los catadores en la valoración de la textura se muestran en la Figura 12.

## Textura



**Fig. 12:** Promedio de las puntuaciones medias de las salchichas atributo: textura

Puede observarse que los embutidos empleados con cultivos iniciadores de los tratamientos (B, C y D) presentaron similares valor comprendidos entre 3,6 a 3,5; seguido por el tratamiento A (control) con una puntuación de 2,8. Las diferencias observadas entre los distintos tratamientos fueron estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ), percibidas por los catadores entre los tratamientos, se puede establecer que los cultivos iniciadores empleados presenta efecto sobre la característica textura de las salchichas.

Las ligeras diferencias de la textura obtenidas en este trabajo se muestran coincidentes con los resultados observados por Mata, (1999) y Rodríguez, (2011)



que comprobaron que los embutidos inoculados con fermentos lácticos presentaban mayor dureza que los embutidos no inoculados. Sin embargo, Flores *et al.* (1997) inoculando un cultivo mixto de *Lactobacillus sake* y *Staphylococcus carnosus* obtuvieron mejores resultados en los embutidos inoculados, que se mostraban menos duros que los no inoculados. Según estos mismos autores y Gimeno *et al.*, (1999), el rápido descenso del pH que se produce cuando se utilizan cultivos lácticos afecta positivamente a la textura del producto, ya que el bajo pH afecta a la solubilidad de las proteínas. También desde el punto de vista tecnológico la sal ejerce un papel primordial en la ligazón de la pasta ya que favorece la solubilidad de las proteínas miofibrilares del musculo, y con ello el desarrollo de la textura (Lucke, 1998).

#### **4.4. PROTEÓLISIS DE LAS PROTEÍNAS SARCOPLASMICAS Y MIOFIBRILARES**

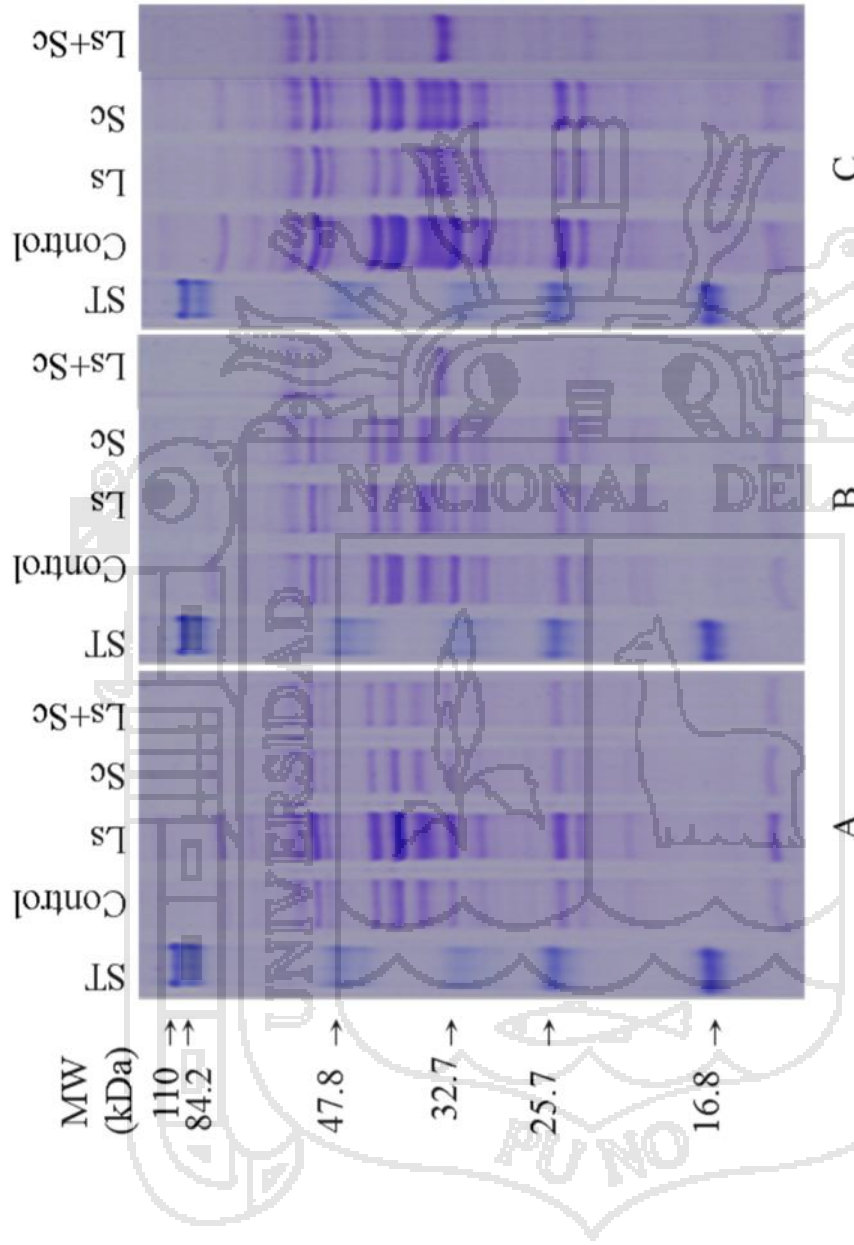
La proteólisis implica un descenso de la cantidad de proteínas de elevado peso molecular y un incremento de las fracciones nitrogenadas de tamaño inferior.

##### **4.4.1. Proteólisis de las proteínas sarcoplasmicas**

Un aspecto muy importante en la calidad de la carne es la degradación proteolítica. Como se mencionó en la sección 2.4.2.2 existe una polémica en el sentido de determinar si existe actividad proteolítica de las bacterias lácticas sobre las proteínas miofibrilares mientras algunos autores mencionan que si tiene efecto las bacterias lácticas sobre las proteínas miofibrilares otros concluyen que no se tiene actividad importante (Toldrá, 2000a).

Los patrones electroforéticos de las proteínas sarcoplásmicas de las salchichas fermentados con y sin cultivos iniciadores se muestran en la Figura 13, analizados durante las etapas de fermentación y maduración. El mayor cambio en el patrón de proteínas sarcoplásmico se produjo entre los (0 días) de procesamiento presentando un peso molecular 53.8 kDa de y a los 3 días de la etapa de fermentación, mientras que sólo las pequeñas diferencias se observaron durante la etapa de maduración, en el tratamiento control y las empleadas con cultivos iniciadores. Las bandas de proteínas en el 36, 30 y 25,7 kDa desaparecieron durante los primeros 3 días de salchicha con una mezcla de cultivos iniciadores.

La intensidad de las bandas evaluadas a los 0, 3 y 21 se observaron que solo los empleados con cultivos iniciadores presentaron cambios. Posteriormente a los 3 días las bandas péptidos disminuyeron a 36, 30, 25,7 y 20 kDa. A partir de entonces, estas bandas desaparecieron en los tratamientos D empleados con cultivos iniciadores *L. sakei* - *S. carnosus* durante la fermentación y maduración de los embutidos.



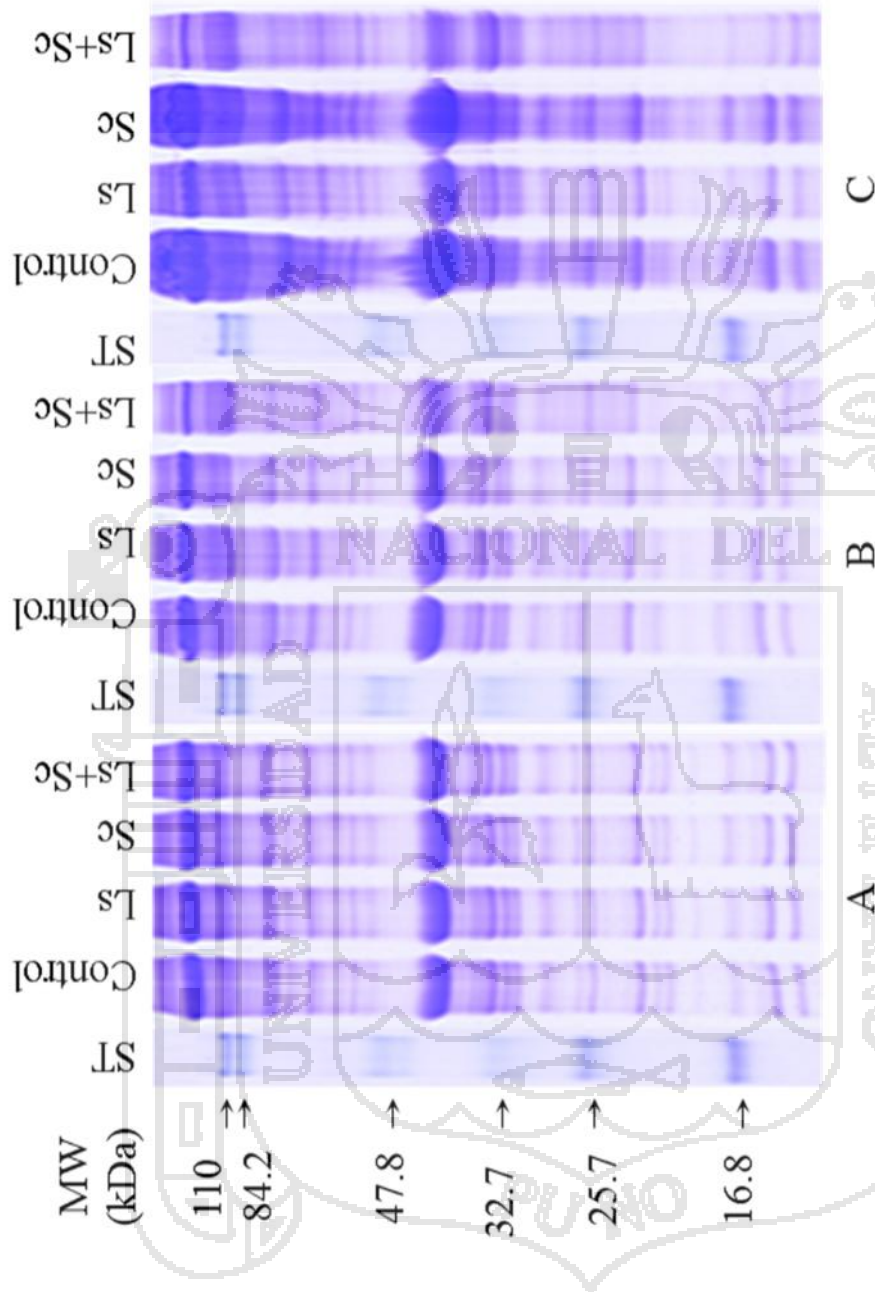
**Fig. 13:** Perfil de SDS-PAGE de proteínas sarcoplasmicas durante el procesamiento y almacenaje de salchichas fermentadas. ST: (patrón standard); control: (sin cultivo iniciador); Ls: (L. sakei ) Sc: (S. carnosus) y Ls + Sc: (L. sakei - S. carnosus). A = 0 día; B = 3 día y C = 21 día.

Los resultados del presente estudio estuvo de acuerdo con la literatura disponible, mientras que las proteínas sarcoplásmico se vieron afectados por el músculo y las enzimas endógenas microbiológica, lo que indica que las proteasas endógenas y cultivo iniciador desempeñar un papel significativo en la proteólisis durante la maduración de los embutidos fermentados. Por otro lado, las salchichas sin cultivo iniciador mostraron una actividad más débil de las proteasas endógenas en comparación con las proteasas exógenas reportada por (Córdova *et al.*, 1994).

#### 4.4.2. La proteólisis de las proteínas miofibrilares

La electroforesis SDS-PAGE de las proteínas miofibrilares se muestran en la Figura 14. La intensidad de la banda disminuyó gradualmente después de la fermentación y el secado en la muestra control, pero sólo en algunos tratamientos se detectaron diferencias en la fermentación y maduración en las muestras aplicadas con cultivos iniciadores *L. sakei* - *S. carnosus*. Esto se debe probablemente al descenso del pH (Sanz, *et al.*, 1999a).

Las principales diferencias se observaron en el 80, 40, 34, 30, 18 y 16,8 kDa durante 0 y 3 días. Su intensidad disminuyó durante la fermentación. La banda de 80 kDa degradado completamente en el tratamiento D empleado con cultivo iniciador *L. sakei* - *S. carnosus*, después del día 3, pero no se degrada por completo en el tratamiento control y en las aplicadas con cultivo iniciador a las salchichas fermentados. En los días 0 a 3 la intensidad de las bandas de 45 kDa que viene a hacer la actina disminuyo en todos los tratamientos. En los días 0 a 3 la intensidad de las bandas de 45 kDa (actina) disminuyó en todos los tratamientos.



**Fig. 14:** Perfil de SDS-PAGE de proteínas miofibrilar durante el procesamiento y almacenaje de salchichas fermentadas. ST: (patrón standard); control: (sin cultivo iniciador); Ls: (L. sakei); Sc: (S. carnosus) y Ls + Sc: (L. sakei - S. carnosus). A = 0 día; B = 3 día y C = 21 día.

La degradación de la actina (45 kDa) durante la maduración de salchichas fermentados se encontraba diferente con lo reportado por (Díaz *et al.*, 1997a), pero de acuerdo con los resultados reportados por (Toldrá *et al.*, 2000a). Tropomiosinas (T1 y T2, 38 y 30 kDa) disminuyó durante la maduración, mientras que la tropomiosina T1 y otras bandas tales como 66 y 97 kDa acumulado durante el almacenamiento en el tratamiento control de las salchichas fermentados.

Esta acumulación también se detectó en las salchichas del tratamiento C mas no detecto en los demás tratamientos. Cadenas ligera de la miosina (MLC1 y MLC2, 24 y 20 kDa) también se degrada y desaparece durante la maduración de los embutidos. Según lo informado por Díaz *et al.*, (1997a), durante la fermentación y maduración de los embutidos fermentados secos a un gran número de reacciones bioquímicas asociadas a la degradación de las proteínas miofibrilares y sarcoplásmico se llevó a cabo. Estas reacciones bioquímicas son promovidas por endopeptidasas muscular (calpaínas I y II y las catepsinas B, D, H y L) según lo informado por Toldrá (1998b).

#### **4.5. VIDA ÚTIL DE LAS SALCHICHAS**

Para el cálculo de la vida útil del producto fueron tomados únicamente los resultados de pérdida de peso, ya que la evolución microbiana no tuvo crecimiento en ninguna de las muestras.

#### 4.5.1. Evolución microbiológica

Con el propósito de comprobar la ausencia de microorganismos patógenos en los tratamientos aplicados con cultivos iniciadores en las salchichas, se realizaron pruebas microbiológicas descritas con anterioridad para la identificación y conteo de *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, se tomó este parámetro considerando lo repostado por Mata, (1999) menciona que los microorganismos responsables de las tox infecciones alimentarias son incapaces de crecer cuando la  $a_w$  es inferior a 0,91, a excepción del *Staphylococcus aureus* en aerobiosis, que puede desarrollarse incluso a  $a_w$  de 0,860. En la Tabla 8 se presentan los valores medios y desviación estándar de la evolución del recuento de estos microorganismos. Esta ausencia puede ser debida al predominio de los *Lactobacillus* creando un medio ácido, y con ella alcanzándose un bajo pH que evita el crecimiento de estos microorganismos.

**Tabla 8:** Valores medios y desviación estándar de los recuentos de bacterias *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* (ufc/ml muestra).

Trat.	Tiempo (días)		
	0	5	15
A- control	ND	ND	ND
B- <i>L.sakei</i>	ND	ND	ND
C- <i>S.carnosus</i>	ND	ND	ND
D - <i>Ls + Sc</i>	ND	ND	ND

Dónde: ND = no determinado

Los resultados observados de estas pruebas microbiológicas presentan ausencia de estos microorganismos. Se estableció entonces que las salchichas mantienen su calidad microbiológica durante el período de almacenamiento, siendo así seguro para el consumo.

#### 4.5.2. Pérdida de pesos

Para establecer los días que las salchichas tenían que permanecer almacenadas en la cámaras de maduración se tomó como parámetro de control el porcentaje de pérdida de peso de las salchichas, estos valores se muestran en la tabla 9 donde se observa que los tratamientos C y D llegan a un porcentaje de 22 a 25% de pérdida de peso promedio a los 21 días de maduración y considerando lo reportado por Varman y Sutherland (1998) estableció un porcentaje de humedad que deben presentar los productos cárnicos madurados secado en un rango de 20 ~ 30%. También se consideró lo señalado por (Liestener, 1995) reportando un rango del peso (mermas) que puede oscilar entre un 20 ~ 40 % del peso inicial de durante la maduración. Al establecer que dichos tratamientos tendrían un periodo de elaboración adecuado a los 21 días, entonces desde ese momento el producto estaría dispuesto para su comercialización en el mercado.

Los porcentajes de pérdida de peso de los tratamientos almacenadas a distintas temperaturas, el tratamiento D presento mejores valores porcentuales de pérdida de peso en función del tiempo y temperatura así a 15 °C un peso final de 28,41% a 20 °C 28,65% y de 31,14% a 25 °C seguido por el a tratamiento C presentando valores de 31,93% a 15 °C, 29,12% a 20 °C y 34,92% 25°C. Los tratamientos A y C mostraron valores que oscilan entre 35,47 a 31,20 % a una temperatura de 15 °C de 36,86 a 31,42% a 20 °C y para una temperatura de 25°C de almacenamiento presento valores de peso merma comprendidos entre 41,65 a 35,62%.



**Tabla 9.** Promedios de pérdida peso durante el tiempo de almacenamiento a diferentes temperaturas.

Temperatura °C	Tiempo (días)	Tratamientos							
		A		B		C		D	
		g.	%	g.	%	g.	%	g.	%
15 °C	0	72.30	27.7	76.11	23.89	75.00	25.00	78.1	21.9
	5	70.42	29.58	73.16	26.84	73.49	26.51	76.4	23.6
	10	68.24	31.76	71.66	28.34	72.54	27.46	75.2	24.8
	15	66.84	33.16	70.04	29.96	71.37	28.63	73.3	26.7
	20	64.53	35.47	68.8	31.2	68.07	31.93	71.59	28.41
20 °C	0	73.38	26.62	75.93	24.07	78.25	21.75	78.84	21.16
	5	70.98	29.02	73.95	26.05	75.72	24.28	77.43	22.57
	10	66.88	33.12	71.5	28.5	73.71	26.29	74.94	25.06
	15	64.2	35.8	70.47	29.53	71.01	28.99	73.86	26.14
	20	63.64	36.36	68.57	31.43	70.88	29.12	71.35	28.65
25 °C	0	72.74	27.26	76.18	23.82	74.16	25.84	77.82	22.18
	5	68.53	31.47	74.83	25.17	73.47	26.53	75.88	24.12
	10	65.51	34.49	71.99	28.01	70.16	29.84	72.6	27.4
	15	63.92	36.08	69.39	30.61	67.01	32.99	69.29	30.71
	20	58.35	41.65	64.38	35.62	65.06	34.94	68.86	31.14

Dónde: A = Control, B = *L. sakei* C = *S.carnosus* y D = *L. sakei* + *S. carnosus*

#### 4.5.3. Cálculo de la vida útil

Para el cálculo de la vida útil del producto fue tomado únicamente los resultados del porcentaje de pérdida de peso ya que la evolución microbiológica no tuvo crecimiento en ninguno de los tratamientos. Como se evidenció anteriormente los tratamientos B y D son los que mejor presentan mejores valores registrados en comparación con los demás tratamientos. En la Figura 15 del anexo

XXXVI se muestra la relación lineal entre el porcentaje de pérdida de peso y el tiempo para los 4 tratamientos además se puede observar que los  $R^2$  para cada una de las rectas son valores altos, por lo tanto es aceptable la evolución de los porcentajes de pérdida de peso como un modelo matemático. Para determinar la vida útil se consideró un porcentaje de pérdida de peso máximo en un valor de 30% para las salchichas.

Calculo velocidad constante de deterioro, utilizando la siguiente formula:

$$t_u = \frac{Q_0 - Q_f}{k}$$

$Q_f$  = Concentración final del factor al tiempo t.

$Q_0$  = Concentración inicial del factor al tiempo 0.

t = Tiempo de estabilidad (días).

k = Constante de velocidad a la temperatura estudiada.

En la Figura 15 se muestra la relación lineal entre el porcentaje de pérdida de peso y el tiempo para el tratamiento D. se obtuvo la siguiente ecuación de regresión, con un coeficiente de regresión cercano a la unidad ( $R^2 = 0.9955$ ):

$$\% \text{ PP} = -0.321 (t) + 25 \dots\dots\dots(6)$$

En la ecuación 6 se despejo el tiempo y se reemplazó el valor máximo establecido de pérdida de peso.

$$t_u = \frac{25 - 78.13}{-0.321} = 165.39(\text{días})$$

Finalmente, en la Tabla 10 se observa que el tratamiento D tiene una vida útil más prolongada en relación a los demás tratamientos, siendo este los valores de 165.39 días, es decir 5 ½ de meses almacenadas a temperatura de 15°C, también a 20 °C duraría 141.10 días cerca de cinco meses y finalmente almacenadas a temperatura de 25 °C tendría una vida útil de 107, 68 días, 3 meses aproximadamente.

**Tabla 10.** Estimación de la vida útil de las salchichas (almacenadas a distintas temperaturas)

T° de almacenamiento	Trat.	Q <sub>0</sub>	K	Q <sub>f</sub>	Vida útil (días)	Vida útil meses
15 °C	A	25	- 0.382	72.29	123.63	4.12
	B	25	- 0.355	75.50	142.41	4.74
	C	25	- 0.319	75.29	157.40	5.24
	D	25	- 0.321	78.13	<b>165.39</b>	<b>5.51</b>
20 °C	A	25	- 0.525	73.07	91.54	3.05
	B	25	- 0.364	75.72	139.30	4.64
	C	25	- 0.386	77.77	135.53	4.50
	D	25	- 0.371	78.99	<b>145.51</b>	<b>4.85</b>
25 °C	A	25	- 0.66	72.48	71.10	2.37
	B	25	- 0.58	77.16	89.82	2.99
	C	25	- 0.49	74.90	101.21	3.37
	D	25	- 0.49	77.76	<b>107.68</b>	<b>3.58</b>

Dónde: A = Control, B = *L. sakei* C = *S. carnosus* = y D = *L. sakei* + *S. carnosus*

Los productos cárnicos madurados tienen un tiempo de vida útil relativamente largo, debido a las características fisicoquímicas (pH, a<sub>w</sub>) y microbiológicos que proporcionan estabilidad durante el tiempo. Al determinar un tiempo de vida útil aproximadamente de 5 meses para las salchichas fermentadas

se reconoce un periodo de vida útil largo. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Rodríguez (2011), quien determinó un tiempo de vida útil de aproximadamente 5 meses para los productos empleados con microorganismos probióticos, calculados con los valores de pérdida de peso. Estableciendo de esta forma una alternativa para la determinación de vida útil en productos cárnicos madurados mediante el empleo de los valores de pérdida de peso.



## V. CONCLUSIONES

1. En las salchichas aplicados con *L. sakei* + *S. carnosus* produjeron un descenso de pH más acusadas durante la etapa fermentación alcanzaron valores promedios de 5.5 ~ 5.8 seguido por el tratamiento aplicado con *L. sakei* mientras que los demás tratamientos mostraron una caída lenta, hasta su fase final de maduración. En cuanto a la actividad de agua ( $a_w$ ) esta experimento una evolución similar en todos los tratamientos descendiente hasta valores próximos de 0,8197 no se aprecian diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Asimismo en cuanto a los parámetros microbiológicos, las salchichas aplicadas con cultivos iniciadores mostraron recuentos de BAL significativamente más elevadas ( $p < 0,05$ ) que el tratamiento control, igualmente estos tratamientos mostraron los menores recuentos de bacterias viables totales y coliformes totales.
2. En las pruebas de análisis organoléptico que se realizaron las salchichas de tratamiento D, alcanzó valores superiores en todos los atributos analizados, en cuanto a sabor y aceptabilidad no se encontró diferencias significativas al ( $P > 0.05$ )
3. Los resultados obtenidos por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) muestran que los cultivos iniciadores *L. sakei*, *S. carnosus* no presenta actividad proteolítica evidente sobre las moléculas de las proteínas miofibrilares durante la etapa de procesamiento, mientras que en las proteínas sarcoplasmicas mostraron un ligero cambio de las bandas durante la etapa de procesamiento en todas los tratamientos.
4. El tratamiento aplicado con *L. sakei* + *S. carnosus* provee al producto la vida útil más prolongada que es de 165 días a 15°C, 145 días a 20°C y 107 días a 25°C dándole una ventaja frente a otros embutidos tipo chorizo que se encuentran en el mercado.

## VI. RECOMENDACIONES

- Evaluar la posibilidad de utilizar microorganismos probióticos para la elaboración de otros embutidos, ya que presenta una reducción en los costos y ofrece aceptables características sensoriales.
- Evaluar el perfil de aminoácidos y de ácidos grasos saturados e insaturados de cada tratamiento para determinar la calidad nutritiva de las salchichas.
- Identificar las bacterias ácido lácticas presentes en las salchichas, así como también determinar su capacidad para producir aminas biógenas.
- Estudiar la utilización de tripas artificiales de celulosa, para embutir salchichas inoculadas con cultivos iniciadores y realizar de un estudio de vida en anaquel.
- Identificar formas adecuadas de presentación de productos cárnicos fermentados madurados para la venta.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo H. C. (2004). Desarrollo, optimización y estudio de vida útil de nugget de pollo liviano en calorías y con calcio. Universidad de Chile Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Memoria Para Optar Al Título De Ingeniero En Alimentos Santiago-Chile bibliografía
- Axelsson, L. T. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. En: Salminen, S., Von Wright, A., Ouwehand, A. (Eds.), Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. 3rd rev. and exp. Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, pp.1-66.
- B.O.E. (2002). Real Decreto 142/2002, de 1 de febrero, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. Boletín Oficial del Estado, 44 (20/2/2002): 6756-6799.
- Badui, S. (1991). Química de los Alimentos, Editorial Alhambra Mexicana, pp. 156- 160, México, D.F.
- Barco, A., (2008), "Embutidos, Procesamiento y Control de Calidad", Editorial Ripalme, Perú, pp. 205 – 207
- Bello, J. y Sánchez, M .A. (1997). Development of mathematical model to describe the acidification occurring during the ripening of dry fermented sausage. Food Chemistry 59, 101-105.
- Carballo, J. y Larrañaga, J, (1998). Control e Higiene de los Alimentos. Editorial Mc Graw Hill, Madrid, España, pp. 32-37.

- Carrascosa, A. V. y Cornejo, I. (1991). Characterization of *Micrococcaceae* strains selected as potential starter cultures to Spanish dry-cured ham process. 2. Slow process. *Fleischwirtschaft* 71, 1187-1188.
- Cid, C., Astiasaran, I. y Bello, J. (1992). Influencia de las tecnologías de elaboración de diferentes productos cárnicos crudos curados sobre la fracción miofibrilar de las proteínas. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de los Alimentos* 32, 59-70.
- Córdoba, J., Antequera, T., Ventanas, J., López-Bote, C., García, C. y Asensio, M.A. (1994). Hydrolysis and loss of extractibility of proteins during ripening of Iberian ham. *Meat Science*, 37, 217-227.
- Díaz, O., Fernández, M., García de Ferando, G.D., De la Hoz, L. y Ordóñez, J.A. (1997a). Proteolysis in dry fermented sausages: The effect of selected exogenous proteases. *Meat Science* 46, 115-128.
- Díaz, R. Olga. (1994b). Efecto de la adición de proteasas en el proceso madurativo de los embutidos crudos curados. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de veterinaria departamento de nutrición y bromatología III (higiene y tecnología de los alimentos).
- Fadda, S., Chambon C., Champomier, V., Talon R. y Vignolo, G.( 2008). *Lactobacillus* role during conditioning of refrigerated and vacuum-packaged Argentinean meat, *Meat Sci*; 79: 603–610.
- Feria, C. y, Pedro F. (2007). Aislamiento y caracterización Bacteriocinas producidas por *lactobacillus plantarum* LPBM10 en suero de leche. Tesis Msc Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias. Medellín-Colombia. pp 84,.



- Flores, J., Marcus, J.R., Nieto, P., Navarro, J.L. y Lorenzo, P. (1997). Effect of processing conditions on proteolysis and taste of dry-cured sausages. *Z Lebensm Unters Forsch A* 204, 168-172.
- Franco, I.;Prieto, B.;Cruz, J. M. y Carballo, J. (2002). Study of the biochemical changes during the processing of Androlla, a Spanish dry- cured pork sausage. *Food Chemistry* 78, 339-345.
- Frey, W. (1995). "Fabricación fiable de embutidos", Editorial Acribia, Zaragoza – España. pp: 17– 22
- García, M.L., Selgas, M.D., Fernández, M. and Ordóñez, J.A. (1992). Microorganisms and lipolysis in the ripening of dry fermented sausages. *International Journal of Food Science and Technology* 27, 675-682.
- Garriga, M., Hugas, M., Gou, P., Aymerich, M.T., Arnau, J. y Monfort, J.M. (1996). Technological and sensorial evaluation of *Lactobacillus* strains as starter cultures in fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* 32, 173-183.
- Gimeno, O., Astisaran, I. y Bello, J. (1999). Influence of Partial. Replacement of NaCl with KCl and CaCl<sub>2</sub> on Texture and Color of Dry Fermented. Sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 873-877.
- Gonzalez-Fernandez, C., Santos, E.M., Jaime, I. y Rovira, J. (1997). Utilización de cultivos iniciadores en la elaboración de chorizo y su influencia en las propiedades sensoriales. *Food Science and Technology International* 3: 31-42.
- Hammes, P. W., Tichaczek, S. P. (1994). The potencial of lactic acid bacteria for the production of safe and wholesome food. *Lebensmittel-Untersuchung und-forschung*. 198:193-201.

- Hansen, E. B. (2002). Comercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology* 78, 119 – 131.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, T. y Monfort, J. M. (1993). Biochemical characterization of lactobacilli from dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 18, 107-113.
- Kröckel, L. (1995). Bacterial fermentation of meats. In: *Fermented Meats*. Eds. G. Campbell- Platt and P.E. Cook. Glasgow. U.K. pp. 69-130.
- Labuza, T. (1994). Determinación de la vida en anaquel de alimentos mediante pruebas aceleradas.
- Landvogt, A. y Fischer, A. (1990). Dry sausage ripening. Targeted control of the acidification capacity of the starter cultures. *Fleischwirtschaft* 70, 1134-1140.
- Leistner, L. (1995). Stable and safe fermented sausages world-wide. En *Fermented Meats*. Eds. Campbell-Platt, G. and Cook, P.E. Blackie Academic & Professional, Glasgow, Reino Unido, pp. 160-175.
- Liepe, H., Pfeil, E. y Porobic, R. (1990). Influence of sugars and bacteria on dry sausage souring. *Fleischwirtschaft* 70, 189-192.
- López, T. M., González, C.J., Rodríguez, R. Encinas J.P. y Otero, A. (2001). Utilización de mohos y levaduras en la elaboración de embutidos cárnicos fermentados. *Alimentaria*. Marzo: 25-31.
- Lücke, F. K. (1998). Fermented sausages. En *Microbiology of Fermented Foods*, Wood, B. J. B. (ed), pp. 441-483. Blackie Academic and Professional. Londres, Reino Unido.

- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. (2004). Brock. Biología de los Microorganismos. 10a ed. Ed. Prentice Hall. Madrid, España. pp. 122, 352, 400-402, 991.
- Martín, J. B., (2005). Estudio de las comunidades microbianas de embutidos fermentados ligeramente acidificados mediante técnicas moleculares. Universidad de Girona. Tesis doctoral.
- Mata, A. C. (1999). Empleo de fermentos lácticos en la fabricación de productos cárnicos. Tesis doctoral de la Universidad de Córdoba Facultad de Veterinaria. Córdoba 2 de Diciembre.
- Minor, P. H., (1999). Cambios en parámetros fisicoquímicos relacionados con la calidad de la carne de cerdo sometida a fermentación láctica como método de bioconservación. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Investigación de tesis. México.
- Mira, J., (1998), “Compendio de Ciencia y Tecnología de la Carne”, Editorial Docucentro ESPOCH, Riobamba, Ecuador, pp. 120-130.
- Montel, M.C., Talon, R., Berdague, J.L. y Cantonnet, M. (1993). Effects of starter cultures on the biochemical characteristics of french dry sausage. Meat Science 35, 229-240.
- Morales, I. (2008). “Vida útil de Alimentos” disponible en:  
[www.cita.ucr.ac.cr/documentos/Informeannual.pdf](http://www.cita.ucr.ac.cr/documentos/Informeannual.pdf), (Abril, 2011).
- Murano. (1997). Microbiología de la Carne. Memorias del V Cursillo Teórico- Práctico de Tecnología Cárnica. Ames, Iowa: Iowa State University.

- OEA, (2003). Laboratorio de control de calidad, disponible en:  
<http://www.science.oas.org>, 23-05-2011.
- Ordóñez, J.A., Fernández, M., Díaz, O., Hierro, E., García de Fernando, G.D. y de la Hoz, L. (1995). Papel de los microorganismos en la maduración de los embutidos crudos curados. AICE 48, 9-13.
- Pascual, M.R. (1992). Derivados cárnicos. In Microbiología Alimentaria. Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas. Madrid, Díaz de Santos, S.A. pp. 151-160.
- Pólit, P, (2006). Determinación de la Vida Útil de Alimentos Procesados. Primer Congreso Ecuatoriano de Ingeniería de Alimentos, Ambato – Ecuador.
- Prändl, O., Fischer, A., Schmidhofer, T., y Sinell, H.J. (1994). Tecnología e Higiene de la Carne. Ed. Acribia, Zaragoza.
- Price, J. (1994), “Ciencia de la carne y de los productos cárnicos”, Segunda edición, Editorial Acribia, Zaragoza – España. pp: 433 – 435
- Ranken, M., (2003). “Manual de Industrias de la Carne”. Editorial Blackwell Science, Londres, pp 13.
- Raveendran, J.V., Ingham, S.C., Mc Curdy, A.R. y Jones, G.A. (1993). Anaerobic microbiology of fresh beef packaged under modified atmosphere or vacuum. *Journal of Food Science*, 58:935-938
- Roca, M. y Incze, K. (1990). Fermented sausages. *Food Rev. Int.* 6, 91-118. Varnan, A.H. y Sutherland, J.P. (1998). Carne y productos cárnicos. Tecnología, química y microbiología. Editorial Acribia, S.A., Zaragoza.

- Rodríguez C. V., (2011). “Efecto del empleo de microorganismos probióticos (*Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium animalis spp. lactis*) en la elaboración de un producto cárnico madurado tipo salami”. Universidad Técnica de Ambato Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Investigación de tesis Ambato – Ecuador.
- Rojas, F.J., Jodral, M., Gosalvez, F. y Pozo, R. (1991). Mycoflora and toxinogenic *Aspergillus flavus* in Spanish dry-cured ham. *International Journal of Food Microbiology* 13, 249-256.
- Roncalés, P. (1994). Tecnología, cambios bioquímicos y calidad sensorial de los embutidos crudos curados. En: *Jornadas Técnicas de Productos Cárnicos*. Valencia, pp. 87-109.
- Ruusunen, M. y Puolanne, E. (2005). Reducing sodium intake from meat products. *Meat Science*, 70: 531-541.
- Salazar, D. (2008). “Apuntes de tecnología de cárnicos”
- Samelis, J., Stavropoulos, S., Kakouri, A. y Metaxopoulos, J. (1994). Quantification and characterization of microbial populations associated with naturally fermented Greek dry salami. *Food Microbiology* 11, 447-460.
- Sanz, Y., Fadda, S., Vignolo, G., Aristoy, M.C., Oliver, G. y Toldrá, F. (1999a). Hydrolytic action of *Lactobacillus casei* CRL 705 on pork muscle sarcoplasmic and myofibrillar proteins. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3441-3448.
- Sanz, Y., Flores, J., Toldrá, F. y Fera, A. (1997b). Effect of pre-ripening on microbial and chemical changes in dry fermented sausages. *Food Microbiology* 14, 575-582.

- Schillinger, U., Geisen, R. y Holzapfel, W.H. (1996). Potential of antagonistic microorganism and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 158-164.
- Sofos, J. N. (1994). Microbial growth and its control in meat, poultry and fish. "Quality Attributes and their Measurement in Meat, Poultry and Fish Products". Chap. 14. Great Britain : Blackie Academic & Professional.
- Stiles, M.E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular microbiology* 70, 331-345.
- Tinedo, V. (1998). Alternativas en la elaboración de los embutidos a base de pulpa de pescado. Seminario I. Universidad Central de Venezuela. Instituto en Ciencia y Tecnología de Alimentos. 16 de octubre. Caracas (Mimeografiado), 24-48 pp.
- Toldrá, F. (1998b). Proteolysis and lipolysis in flavor development of dry-cured meat products. *Meat Science* 49, 101-110.
- Toldrá, F. (2000a). The role of muscle enzymes in dry-cured meat products with different drying conditions. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 164-168.
- Toldrá, F., Aristoy, M.C. y Flores, M. (2000). Contribution of muscle aminopeptidases to flavour development in dry-cured ham. *Food Research International*, 33, 181-185.
- Varnam, A. H. y Sutherland, J. P. (1998). Carne y productos cárnicos. *Tecnología, química y microbiología* Editorial Acribia, Zaragoza-España. pp: 307 – 346
- Weidenfeller, P. y Fegeler, W. (1990). Methodological aspects of a micro-identification technique for the differentiation of coagulase-negative *staphylococci* to species level. *Zentralb Bakteriologie*. 274, 78-90.
- Zeuthen, P. (1995). Historical aspects of meat fermentations. In: *Fermented Meats*. Eds. Campbell-Platt, G. y Cook, P. E. Chapman and Hall. Glasgow, Reino Unido.



ANEXO I.

Cartilla para la evaluación de aceptación del producto

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL**

“Efecto de cultivos iniciadores en la proteólisis y vida útil en salchichas fermentadas”  
Nombre: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Indicaciones:

Se le proporcionará 4 muestras de salchicha, cada una corresponde a un tratamiento diferente

Calificar cada uno de los parámetros de acuerdo a la escala establecida.

- Me disgusta mucho : 1
- Me disgusta : 2
- Es Indiferente : 3
- Me agrada : 4
- Me agrada mucho : 5

TRATAMIENTO	CALIFICACIÓN

Comentarios:.....  
.....  
.....

*GRACIAS.*



ANEXO II.

Ficha de evaluación organoléptica

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL**

“Efecto de cultivos iniciadores en la proteólisis y vida útil en salchichas fermentadas”  
Nombre: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

**INDICACIONES:** por favor deguste las muestras que se presentan y señale la aceptación del atributo sensorial según la escala planteada.

Atributo	Escala				
Color	5	Muy intenso			
	4	Intenso			
	3	Característico			
	2	Poco intenso			
	1	Nada intenso			
olor	5	Muy perceptible			
	4	Perceptible			
	3	Característico			
	2	Poco perceptible			
	1	Nada perceptible			
Sabor	5	Muy acida			
	4	acida			
	3	Ni acida ni amargo			
	2	amargo			
	1	Muy amargo			
Textura	5	Muy dura			
	4	Dura			
	3	Ni dura ni blanda			
	2	Blanda			
	1	Muy blanda			

Observaciones: -----  
-----  
-----  
-----

*GRACIAS.*

## ANEXO III.

Métodos electroforéticos para la caracterización de los perfiles polipeptídicos

**Reactivos:**

- Tampón de carga (pH 8,3): disolver 3,0 g de Tris, 14,4 g de glicina y 1,0 g de SDS en un litro de agua destilada. En la preparación del buffer nativo no incorporado SDS.
- Buffer del gel de concentración (pH 6,8): disolver 6,0 g de Tris y 0,4 g de SDS en 40 mL de agua destilada. Ajustar el pH con HCl 4 N, y completar el volumen a 100 mL. En la preparación del buffer nativo no incorporar SDS.
- Buffer del gel de separación (pH 8,8): disolver 18,2 g Tris y 0,4 g de SDS en 40 mL de agua destilada. Ajustar con HCl 4 N, y completar el volumen a 100 mL. En la preparación del buffer nativo no incorporar SDS.
- Solución de persulfato de amonio: disolver 200 mg de persulfato de amonio en 2 mL de agua destilada, eliminar el gas de la solución y congelar en pequeñas alícuotas. Esta solución permanece estable por aproximadamente cuatro años.
- Solución colorante: disolver 1,25 g de Coomassie Blue R en 227 mL de metanol y 46 mL de ácido acético glacial. Completar con agua destilada a 500 mL.
- Solución decolorante: mezclar 70 mL de ácido acético glacial, 300 mL de etanol y completar el volumen a 1 litro con agua destilada.
- Solución acrilamida / Bis-acrilamida: disolver 30 g de acrilamida y 0,8 g de bis-acrilamida en 100 mL de agua destilada. Almacenar en frasco oscuro a 4 °C.

- Buffer de muestra desnaturante con -mercapto: mezclar 2,5 mL buffer de gel de concentración (pH 6,8), 1,2 g de SDS, 4 mL de glicerol, 2 mL de -mercapto y punta de espátula de azul de bromofenol. Completar a 10 mL.
- Buffer de muestra desnaturante: mezclar 2,5 mL buffer de gel de concentración (pH 6,8), 1 g de SDS, 0,4 g de sacarosa y punta de espátula de azul de bromofenol. Completar a 10 mL.
- Buffer de muestra nativa: mezclar 4 mL buffer de gel de concentración (pH 6,8) (nativo), 4 mL de glicerol y punta de espátula de azul de bromofenol.

#### **Procedimiento para Electroforesis Desnaturante (PAGE-SDS)**

- Los geles se preparan entre dos placas de vidrio perfectamente limpias.
- Colocar los vidrios en el soporte del equipo Bio-Rad, procurando que queden derechos y fijos al soporte.
- Preparar el gel separador al 12 %, mezclando: 1.091  $\mu$ l de agua destilada, 2.004  $\mu$ l de A/BA, 1.300  $\mu$ l de buffer a pH 8,8, 50  $\mu$ l de SDS al 10%, 50  $\mu$ l de PSA al 10% y 5  $\mu$ l de TEMED, con agitación.
- Colocar en seguida 3,5 mL del gel separador entre los vidrios, con la ayuda de una micropipeta. Cubrir la superficie con agua saturada con butanol, la que debe ser adicionada lentamente.
- Esperar a que la solución gelifique por completo, lo cual se evidencia por la formación de una línea divisoria nítida entre el gel y el agua con butanol.

- Sacar los vidrios del soporte y retirar la capa de agua saturada con butanol, lavando con abundante agua destilada.
- Secar entre los vidrios con papel absorbente.
- Preparar gel de concentración al 5 %, mezclando: 1.050  $\mu$ l de agua destilada, 250  $\mu$ l de A/BA, 190  $\mu$ l de buffer a pH 6,8, 15  $\mu$ l de SDS al 10%, 15  $\mu$ l de PSA al 10% y 1,5  $\mu$ l de TEMED, con agitación.
- Colocar en seguida 1,5 mL (o hasta que rebalse) gel concentrador entre los vidrios (sobre el gel separador), con la ayuda de una micropipeta.
- Usando guantes colocar el peine, procurando que no queden burbujas.
- Esperar a que el gel concentrador gelifique por completo.
- Retirar los vidrios del soporte y colocarlos en la cubeta de corrida del equipo Bio-Rad, con el peine hacia adentro. Continuar el procedimiento de igual forma que para electroforesis nativa.

ANEXO IV.

Valores de pH (media  $\pm$  desviación estándar).

Tratamientos	Tiempo (días)				
	0	3	6	12	21
A - control	6,10 $\pm$ 0.10 a	5,97 $\pm$ 0.06 c	5,80 $\pm$ 0.20 b	5,73 $\pm$ 0.21 b	5,60 $\pm$ 0.20 b
C - <i>S.carnosus</i>	5,90 $\pm$ 0.10 a	5,80 $\pm$ 0.17 bc	5,73 $\pm$ 0.06 b	5,23 $\pm$ 0.06 a	5,20 $\pm$ 0.10 a
B- <i>L.sakei</i>	6,00 $\pm$ 0.10 a	5,67 $\pm$ 0.15 ab	5,60 $\pm$ 0.20 b	5,13 $\pm$ 0.06 a	5,10 $\pm$ 0.10 a
D - <i>Ls + Sc</i>	6,03 $\pm$ 0.21 a	5,50 $\pm$ 0.10 a	5,30 $\pm$ 0.10 a	5,07 $\pm$ 0.06 a	5,03 $\pm$ 0.15 a

ANEXO V.

Valores de  $a_w$  (media  $\pm$  desviación estándar).

Trat.	Tiempo (días)				
	0	3	6	12	21
A - control	0,9718 $\pm$ 0.0031 b	0,9604 $\pm$ 0.0070 b	0,9356 $\pm$ 0.0057 a	0,9293 $\pm$ 0.0031 c	0,8914 $\pm$ 0.0098 c
B- <i>L.sakei</i>	0,9668 $\pm$ 0.0030 ab	0,9521 $\pm$ 0.0082 ab	0,9306 $\pm$ 0.0153 a	0,9096 $\pm$ 0.0142 b	0,8389 $\pm$ 0.0077 b
D - <i>Ls + Sc</i>	0,9652 $\pm$ 0.0050 ab	0,9323 $\pm$ 0.0160 a	0,9157 $\pm$ 0.0110 a	0,8888 $\pm$ 0.0130 a	0,8197 $\pm$ 0.0078 a
C - <i>S.carnosus</i>	0,9699 $\pm$ 0.0093 a	0,9405 $\pm$ 0.0078 ab	0,9217 $\pm$ 0.0740 a	0,9105 $\pm$ 0.0046 b	0,8495 $\pm$ 0.0089 b

ANEXO VI.

Valores medios (log ufc/ml muestra) y desviación estándar de los recuentos de bacterias ácido lácticas.

Trat.	Tiempo (días)				
	0	3	6	9	21
A- control	5,30 ± 0,63 a	6,52 ± 0,63 a	7,21 ± 0,49 a	7,21 ± 0,55 a	7,22 ± 0,47 a
B- <i>L.sakei</i>	6,96 ± 0,71 ab	8,46 ± 0,02 b	8,43 ± 0,01 ab	8,47 ± 0,01 ab	8,46 ± 0,02 ab
C- <i>S.carnosus</i>	5,97 ± 0,04 b	6,61 ± 0,43 b	7,82 ± 0,58 ab	7,79 ± 0,52 ab	7,82 ± 0,50 ab
D - <i>Ls + Sc</i>	6,93 ± 0,66 ab	8,93 ± 0,66 a	8,96 ± 0,69 b	8,97 ± 0,70 b	8,98 ± 0,71 b

ANEXO VII.

Valores medios (log ufc/ml muestra) y desviación estándar de los recuentos de bacterias viables totales..

T	Tiempo (días)				
	0	3	6	9	21
A- control	6,62 ± 0,54 a	6,72 ± 0,55 a	6,79 ± 0,59 a	6,83 ± 0,59 a	6,81 ± 0,62 a
B- <i>L.sakei</i>	6,69 ± 0,56 a	6,71 ± 0,54 a	6,64 ± 0,75 a	6,76 ± 0,67 a	6,78 ± 0,62 a
C- <i>S.carnosus</i>	6,51 ± 0,64 a	6,74 ± 0,47 a	6,73 ± 0,54 a	6,70 ± 0,56 a	6,76 ± 0,43 a
D - <i>Ls + Sc</i>	6,66 ± 0,56 a	6,77 ± 0,50 a	6,84 ± 0,53 a	6,77 ± 0,63 a	6,80 ± 0,54 a

## ANEXO VIII.

Calificaciones sensoriales (media  $\pm$  desviación estándar).

Trat.	Aceptabilidad	Color	Olor	Sabor	Textura
A- control	3.5 $\pm$ 0.70	2.8 $\pm$ 0.78	3.1 $\pm$ 0.87	3.5 $\pm$ 0.53	2.8 $\pm$ 0.78
B- <i>L.sakei</i>	4.0 $\pm$ 0.66	3.5 $\pm$ 0.70	3.4 $\pm$ 0.84	3.7 $\pm$ 0.67	3.5 $\pm$ 0.53
C- <i>S.carnosus</i>	3.9 $\pm$ 1.56	3.7 $\pm$ 0.48	3.2 $\pm$ 0.63	3.1 $\pm$ 0.74	3.6 $\pm$ 0.84
D - <i>Ls + Sc</i>	4.2 $\pm$ 0.63	3.4 $\pm$ 0.73	3.4 $\pm$ 5.19	3.6 $\pm$ 0.52	3.5 $\pm$ 0.85

## ANEXO IX.

ANOVA para pH a los 0 días

F. V.	G. L.	S. C.	C. M.	Fc.	Signif.
Tratamientos	3	0,063	0,0211	1.136	n.s
Error experimental	8	0.147	0.018		
TOTAL	11	0.209			

## ANEXO X.

ANOVA para pH a los 3 días

F. V.	G. L.	S. C.	C.M.	Fc.	Sig.
Tratamientos	3	0.353	0,118	7.067	*
Error experimental	8	0.133	0.018		
TOTAL	11	0.487			

Prueba de Duncan para pH a los 3 días

Tratamiento	n	Promedio	Duncan(P 0.05)
Control	3	5.97	a
Sc	3	5.80	ab
Ls	3	5.67	bc
Ls+Sc	3	5.50	c

## ANEXO XI.

ANOVA para pH a los 6 días

F. V.	G. L.	S. C.	C.M.	Fc.	Sig.
Tratamientos	3	0.442	0,147	6.321	*
Error experimental	8	0.187	0.023		
TOTAL	11	0.629			

Prueba de Duncan para pH a los 6 días

Tratamiento	n	Promedio	Duncan(P 0.05)
Control	3	5.80	a
Sc	3	5.73	a
Ls	3	5.60	a
Ls+Sc	3	5.30	b

## ANEXO XII.

ANOVA para pH a los 12 días

F. V.	G. L.	S. C.	C.M.	Fc.	Sig.
Tratamientos	3	0.82 2	0,274	20.562	*
Error experimental	8	0.107	0.013		
TOTAL	11	0.929			

Prueba de Duncan para pH a los 12 días

Tratamiento	n	Promedio	Duncan(P 0.05)
Control	3	5.73	a
Sc	3	5.23	b
Ls	3	5.13	b
Ls+Sc	3	5.07	b



## ANEXO XIII.

## ANOVA para pH a los 21 días

F. V.	G. L.	S. C.	C.M.	Fc.	Sig.
Tratamientos	3	0.580	0,193	9.280	*
Error experimental	8	0.167	0.021		
TOTAL	11	0.747			

## Prueba de Duncan para pH a los 21 días

Tratamiento	n	Promedio	Duncan(P 0.05)
Control	3	5.60	a
Sc	3	5.20	b
Ls	3	5.10	b
Ls+Sc	3	5.03	b

## ANEXO XIV.

ANOVA para  $a_w$  a los 0 días

F. V.	G. L.	S. C.	C.M.	Fc.	Sig.
Tratamientos	3	0.00013	0.000072	2.25	n.s.
Error experimental	8	0.0041	0.000032		
TOTAL	11	0.0039			

## ANEXO XV.

ANOVA para  $a_w$  a los 3 días

F. V.	G. L.	S. C.	C.M.	Fc.	Sig.
Tratamientos	3	0.0015	0,0005	12.50	*
Error experimental	8	0.0035	0.00004		
TOTAL	11	0.002			

Prueba de Duncan para  $a_w$  a los 3 días

Tratamiento	n	Promedio	Duncan(P 0.05)
Control	3	0.9604	a
Ls	3	0.9521	a b
Sc	3	0.9405	ab
Ls+Sc	3	0.9323	b

## ANEXO XVI.

ANOVA para  $a_w$  a los 6 días

F. V.	G. L.	S. C.	C.M.	Fc.	Sig.
Tratamientos	3	0.00013	0,00004	0.16	*
Error experimental	8	0.0022	0.00025		
TOTAL	11	0.0020			

Prueba de Duncan para  $a_w$  a los 6 días

Tratamiento	n	Promedio	Duncan(P 0.05)
Control	3		a
Sc	3		b
Ls	3		b
Ls+Sc	3		b

## ANEXO XVII.

ANOVA para  $a_w$  a los 12 días

F. V.	G. L.	S. C.	C.M.	Fc.	Sig.
Tratamientos	3	0.003	0,001	2.00	n.s.
Error experimental	8	0.0037	0.0005		
TOTAL	11	0.0007			

## ANEXO XIII.

ANOVA para  $a_w$  a los 21 días

F. V.	G. L.	S. C.	C.M.	Fc.	Sig.
Tratamientos	3	0.0041	0.0013	2.149	n.s
Error experimental	8	4.8418	0.605		
TOTAL	11	4.8377			

## ANEXO XIX.

ANOVA para BAL a los 0 días

F. V.	G. L.	S. C.	C.M.	Fc.	Sig.
Tratamientos	3	3,883	1,294	3,886	*
Error experimental	4	1,332	0,333		
TOTAL	7	5,215			

Prueba de Duncan para BAL a los 0 días

Tratamiento	n	Promedio	Duncan(P 0.05)
Control	2	5.50	a
Sc	2	5.97	a b
Ls+Sc	2	6.93	a b
Ls	2	6.96	b

## ANEXO XX.

ANOVA para BAL a los 3 días

F. V.	G. L.	S. C.	C.M.	Fc.	Sig.
Tratamientos	3	9.300	3,100	12,128	*
Error experimental	4	1.022	0.256		
TOTAL	7	10.322			

Prueba de Duncan para BAL a los 3 días

Tratamiento	n	Promedio	Duncan(P 0.05)
Control	2	6.52	a
Sc	2	6.61	a
Ls	2	8.46	b
Ls+Sc	2	8.93	b

ANEXO XXI

ANOVA para BAL a los 6 días

F. V.	G. L.	S. C.	C.M.	Fc.	Sig.
Tratamientos	3	3.429	1,143	4.340	*
Error experimental	4	1.054	0.263		
TOTAL	7	4.483			

Prueba de Duncan para BAL a los 6 días

Tratamiento	n	Promedio	Duncan(P 0.05)
Control	2	7.21	a
Sc	2	7.82	a b
Ls	2	8.43	a b
Ls+Sc	2	8.96	b

ANEXO XXII.

ANOVA para BAL a los 12 días

F. V.	G. L.	S. C.	C.M.	Fc.	Sig.
Tratamientos	3	3.554	1,185	4.438	*
Error experimental	4	1.068	0.297		
TOTAL	7	4.622			

## Prueba de Duncan para BAL a los 12 días

Tratamiento	n	Promedio	Duncan(P 0.05)
Control	2	7.21	a
Sc	2	7.79	a b
Ls	2	8.47	a b
Ls+Sc	2	8.97	b

## ANEXO XXIII.

## ANOVA para BAL a los 21 días

F. V.	G. L.	S. C.	C.M.	Fc.	Sig.
Tratamientos	3	3.488	1,163	4.808	*
Error experimental	4	0.967	0.242		
TOTAL	7	4.455			

## Prueba de Duncan para BAL a los 21 días

Tratamiento	n	Promedio	Duncan(P 0.05)
Control	2	7.22	a
Sc	2	7.82	a b
Ls	2	8.46	a b
Ls+Sc	2	8.98	b

## ANEXO XXIV.

## ANOVA para bacterias viables totales a los 0 días

F. V.	G. L.	S. C.	C.M.	Fc.	Sig.
Tratamientos	3	0.076	0,25	0.793	n.s.
Error experimental	4	0.127	0.32		
TOTAL	7	0.202			

## ANEXO XXV.

ANOVA para bacterias viables totales a los 3 días

F. V.	G. L.	S. C.	C.M.	Fc.	Sig.
Tratamientos	3	0.011	0,004	0.501	n.s.
Error experimental	4	0.030	0.07		
TOTAL	7	0.041			

## ANEXO XXVI.

ANOVA para bacterias viables totales a los 6 días

F. V.	G. L.	S. C.	C.M.	Fc.	Sig.
Tratamientos	3	0.020	0,007	2.014	n.s.
Error experimental	4	0.014	0.03		
TOTAL	7	0.034			

## ANEXO XXVII.

ANOVA para bacterias viables totales a los 12 días

F. V.	G. L.	S. C.	C.M.	Fc.	Sig.
Tratamientos	3	0.035	0,012	0.765	n.s.
Error experimental	4	0.060	0.015		
TOTAL	7	0.095			

## ANEXO XXIII.

ANOVA para bacterias viables totales a los 21 días

F. V.	G. L.	S. C.	C.M.	Fc.	Sig.
Tratamientos	3	0.160	0,053	1.785	n.s.
Error experimental	4	0.120	0.30		
TOTAL	7	0.280			

ANEXO XXIX.

ANOVA para coliformes totales a los 0 días

F. V.	G. L.	S. C.	C.M.	Fc.	Sig.
Tratamientos	3	0.210	0,070	0.6115	n.s.
Error experimental	4	0.429	0.107		
TOTAL	7	0.639			

ANEXO XXX.

ANOVA para coliformes totales a los 3 días

F. V.	G. L.	S. C.	C.M.	Fc.	Sig.
Tratamientos	3	0.210	0,070	0.6115	n.s.
Error experimental	4	0.429	0.107		
TOTAL	7	0.639			

ANEXO XXXI.

ANOVA para aceptabilidad de las salchichas

F. V.	G. L.	S. C.	C.M.	Fc.	Sig.
Bloque (jueces)	9	2,10	0,23	0,4821	n.s.
Entre muestras	3	2,60	0,866	1,815	n.s.
Error experimental	27	12,90	0,477		
TOTAL	39	17,60			

CV = 17,692 %

ANEXO XXXII.

ANOVA para atributo color

F. V.	G. L.	S. C.	C.M.	Fc.	Sig.
Bloque (jueces)	9	9,225	1,025	3,56	*
Entre muestras	3	8,875	2,958	10,16	*
Error experimental	27	7,875	0,291		
TOTAL	39	25,975			

CV = 15,30 %

## Prueba de Duncan para atributo color

Tratamiento	n	Promedio	Duncan(P 0.05)
Control	10	2,8	a
Ls	10	3,5	b
Sc	10	3,7	b
Ls+Sc	10	4,1	b

## ANEXO XXXIII.

## ANOVA para atributo olor

F. V.	G. L.	S. C.	C.M.	Fc.	Sig.
Bloque (jueces)	9	9,255	1,025	2,2920	*
Entre muestras	3	0,675	0,225	0,5031	n.s
Error experimental	27	12,075	0,4472		
TOTAL	39	21,975			

CV = 20,41 %

## ANEXO XXXIV.

## ANOVA para atributo: sabor.

F. V.	G. L.	S. C.	C.M.	Fc.	Sig.
Bloque (jueces)	9	2,225	0,2472	0,57	n.s
Entre muestras	3	2,075	0,6917	1,59	n.s
Error experimental	27	11,675	0,4324		
TOTAL	39	15,975			

CV = 18,92 %



ANEXO XXXV.

ANOVA para atributo: textura.

F. V.	G. L.	S. C.	C.M.	Fc.	Sig.
Bloque (jueces)	9	8,1	0,9	2,73	*
Entre muestras	3	4,1	1,3667	4,146	*
Error experimental	27	8,9	0,3296		
TOTAL	39	21,1			

CV = 17,13 %

Prueba de Duncan para atributo textura

Tratamiento	n	Promedio	Duncan(P 0,05)
Control	10	2,8	a
Ls	10	3,5	ab
Sc	10	3,6	ab
Ls+Sc	10	3,5	b

ANEXO XXXVI.

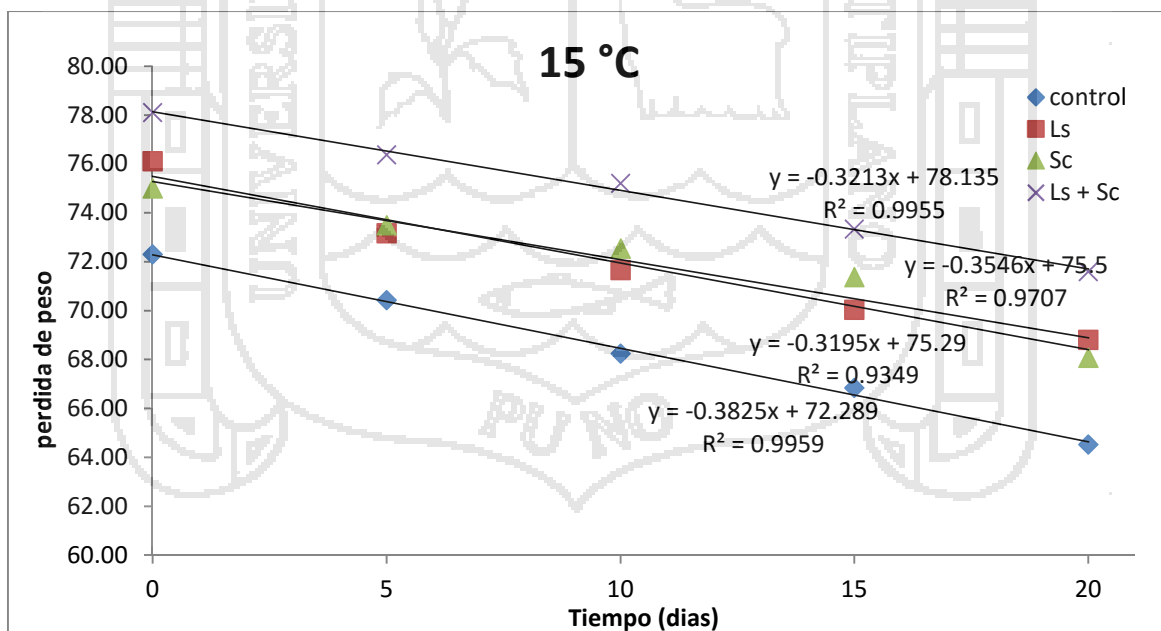


Fig. 15. Evolución del porcentaje de pérdida de peso almacenada a 15 °C

ANEXO XXXVII. Panel fotográfico



**Fotografía 1.** Picado de la carne y grasa



**Fotografía 2.** Molido de la carne en el



**Fotografía 3.** Mezclado en la cutter



molino

**Fotografía 4.** Embutido



**Fotografía 5.** 0 horas de embutido



**Fotografía 6.** 0 días de incubación



**Fotografía 7.** 72 horas de estufaje



**Fotografía 8.** 3 días de estufaje



**Fotografía 9.** 6 días de maduración



**Fotografía 10.** 21 días de maduración



**Fotografía 11.** Colonias de m/o en agar  
MRS (0 días)



**Fotografía 12.** Colonias de m/o en agar  
MRS (21 días)



**Fotografía 13.** Colonias de m/o en agar APC  
APC (0 días)



**Fotografía 14.** Colonias de m/o en agar  
(21 días)



**Fotografía 15.** Colonias de m/o en agar  
VRB (0 días)



**Fotografía 16.** Colonias de m/o en agar  
VRB (21 días)



**Fotografía 19.** Prueba de análisis sensorial



**Fotografía 20.** Catadores

**CHR HANSEN**

*Improving food & health*

**B-2**

Especificación de producto

Forma: Powder, ground  
 N° producto: 501116  
 Composición del cultivo: Lactobacillus sakei

Rendimiento	Especificación
Recuento celular total cfu/g	>4.8E+10
Pureza	Especificación
Bacillus cereus cfu/g	<100
Enterobacterias cfu/g	<10
Enterococos cfu/g	<100
Staphylococcus aureus cfu/g	<50
Total Yeast & Mould cfu/g	<100
Listeria monocytogenes *	Ausente en 25 gr
Salmonella spp. *	Ausente en 25 gr

\* Las pruebas con productos basadas en estadísticas y aspectos medioambientales se realizan constantemente; se pueden facilitar más datos si así se solicitara.

Referencias y métodos analíticos están disponibles si Ud. los requiere.

La información aquí contenida es a nuestro entender verdadera y correcta y es ofrecida de buena fe. Sin embargo, ninguna garantía de infracción de patente está entendida o inferida.

Almacenamiento y caduci

Ver etiquetas y envase del producto

Página: 1/1

[www.chr-hansen.es](http://www.chr-hansen.es)

Versión: 15/FEB/2012 Español

Generado electrónicamente - no necesita firma

Abar M. V. 11/1/19



**CHR HANSEN**

**B-2 SafePro®**

Product Information

Version: 1 PI-EU-EN 12-07-2007

<b>Range</b>	The SafePro® range covers a series of specially developed bioprotective cultures for application in meat products e.g. fermented sausages, fresh sausages and ready-to-eat meat products.
<b>Description</b>	B-2 is a single strain meat culture for bioprotection of cooked or cured meat products. The strain in the culture is able to suppress growth of spoilage and pathogenic bacteria such as indigenous lactic acid bacteria and <i>Listeria monocytogenes</i> . The strain in the culture grows within a wide temperature range down to 2°C (35°F) and survives freezing.
<b>Taxonomy</b>	Lactobacillus sakei
<b>Application</b>	<p><b>Usage</b> B-2 is recommended for bioprotection of cooked or cured meat products that are vacuum-packed or packed in modified atmosphere (MAP). The culture does not ferment lactose and, consequently, if lactose is used as a filler the acid formation will be limited. The meat producer obtains the advantages of maintaining both product safety and sensory quality during shelf life.</p> <p><b>Dosage</b> 25 g culture for 200 kg meat</p> <p><b>Directions for use</b> Sliced cooked ham and emulsion sausages: The culture is applied by spraying a culture suspension onto the surface after cooking. Fresh cured sausages and spreadable sausages: The culture is added directly to the chopper together with the dry ingredients. Raw cured meat products: The culture is added directly to the brine.</p>
<b>Physical Properties</b>	<p><b>Color:</b> Off-white to brownish</p> <p><b>Form:</b> Powder, ground</p> <p><b>Solubility:</b> Water soluble suspension</p>

[www.chr-hansen.com](http://www.chr-hansen.com)

Page: 1 (3)

*The information contained herein is to the best of our knowledge true and correct and presented in good faith. It may be subject to change without further notice. To the best of our knowledge this product does not infringe Intellectual Property Rights of any third party. This information is offered solely for your consideration and verification. Copyright © Chr. Hansen A/S. All rights reserved.*

## B-2 SafePro®

Product Information

Version: 1 PI-EU-EN 12-07-2007

**CHR HANSEN**

**Packaging** Material No: 501116 Size: 50X25 G Type: Alu pouch in box

**Storage and handling** Temperature: < -17 °C / < 1 °F. Conditions: Dry

**Shelf life** For freeze-dried cultures at least 18 months when stored according to recommendations.

**Technical data**

**Physiological data**

<b>Culture composition</b>	<i>Lactobacillus sakei</i>
<b>Growth temperature</b>	
Opt/max/min	25°C/40°C/2°C (77°F/104°F/36°F)
<b>Salt limit</b>	6% salt-in-water. Survives in higher salt-in-water concentrations
<b>Characteristics</b>	Facultative anaerobic L(+)-lactic acid producing
<b>Fermentable sugars</b>	
Glucose (dextrose)	+
Fructose	+
Maltose	-
Lactose	-
Saccharose (sucrose)	+
Starch	-

**Analytical methods**

References and analytical methods are available on request.

**Legislation**

Chr. Hansen's cultures comply with the general requirements on food safety laid down in Regulation 178/2002/EC. Lactic acid bacteria are generally recognized as safe and can be used in food, however, for specific applications we recommend to consult national legislation.

**Ingredients**

See box label.

**Labeling**

Suggested labeling "lactic acid culture" or "starter culture", however as legislation may vary, please consult local legislation.

[www.chr-hansen.com](http://www.chr-hansen.com)

Page: 2 (3)

*The information contained herein is to the best of our knowledge true and correct and presented in good faith. It may be subject to change without further notice. To the best of our knowledge this product does not infringe Intellectual Property Rights of any third party. This information is offered solely for your consideration and verification. Copyright© Chr. Hansen A/S. All rights reserved.*

**B-2 SafePro®**

Product Information

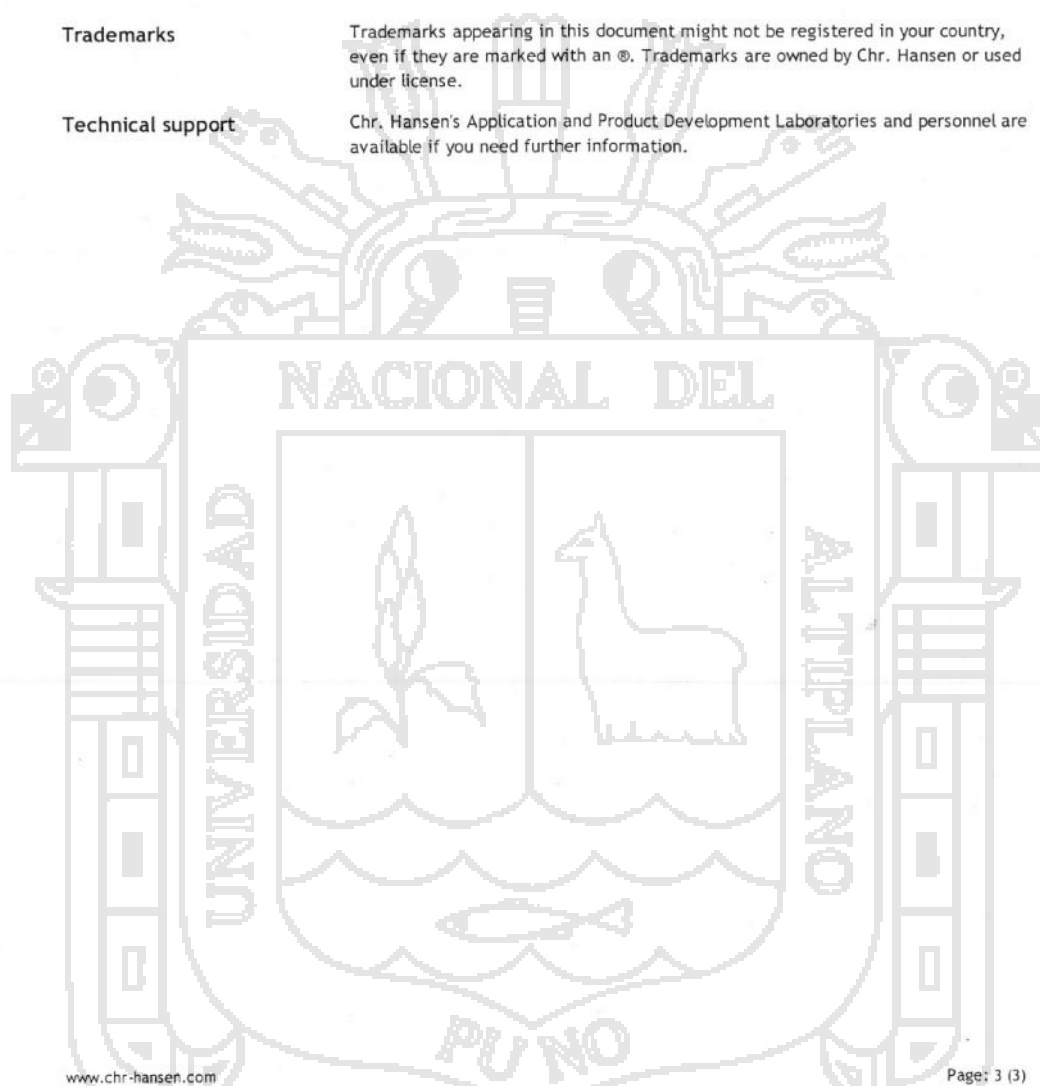
Version: 1 PI-EU-EN 12-07-2007

**CHR HANSEN****Trademarks**

Trademarks appearing in this document might not be registered in your country, even if they are marked with an ®. Trademarks are owned by Chr. Hansen or used under license.

**Technical support**

Chr. Hansen's Application and Product Development Laboratories and personnel are available if you need further information.

[www.chr-hansen.com](http://www.chr-hansen.com)

Page: 3 (3)

*The information contained herein is to the best of our knowledge true and correct and presented in good faith. It may be subject to change without further notice. To the best of our knowledge this product does not infringe Intellectual Property Rights of any third party. This information is offered solely for your consideration and verification. Copyright© Chr. Hansen A/S. All rights reserved.*



**CHR HANSEN***Improving food & health***S-B-61**

Especificación de producto

Forma: Powder, ground  
 N° producto: 502360  
 Composición del cultivo: Staphylococcus carnosus

<b>Rendimiento</b>	<b>Especificación</b>
Recuento celular total cfu/g	>4.8E+09

<b>Pureza</b>	<b>Especificación</b>
Bacillus cereus cfu/g	<100
Enterobacterias cfu/g	<10
Enterococos cfu/g	<100
Staphylococcus aureus cfu/g	<50
Total Yeast & Mould cfu/g	<100
Listeria monocytogenes *	Ausente en 25 gr
Salmonella spp. *	Ausente en 25 gr

\* Las pruebas con productos basadas en estadísticas y aspectos medioambientales se realizan constantemente; se pueden facilitar más datos si así se solicitara.

Referencias y métodos analíticos están disponibles si Ud. los requiere.

La información aquí contenida es a nuestro entender verdadera y correcta y es ofrecida de buena fe. Sin embargo, ninguna garantía de infracción de patente está entendida o inferida.

**Almacenamiento y caduci** Ver etiquetas y envase del producto

Página: 1/1

[www.chr-hansen.es](http://www.chr-hansen.es)

Versión: 15/FEB/2012 Español

Generado electrónicamente - no necesita firma

**CHR HANSEN**

**S-B-61 Bactoferm®**

Información de Producto

Versión: 1 PI-EU-ES 20-09-2007

<b>Gama</b>	La gama Bactoferm® de cultivos cárnicos contiene cultivos de arranque para productos cárnicos fermentados de forma tradicional o rápida. La gama también abarca los cultivos potenciadores de sabor y color e incluye cultivos de moho para aplicaciones en superficie.		
<b>Descripción</b>	S-B-61 es un cultivo cárnico de una cepa, que asegura buen desarrollo de sabor y color pero no aporta acidificación.		
<b>Taxonomía</b>	Staphylococcus carnosus		
<b>Aplicación</b>	<p><b>Uso</b> El cultivo se recomienda para productos cárnicos fermentados con un acidulante químico como Gdl. El cultivo también se puede usar como un cultivo accesorio en combinación con un cultivo Bactoferm® acidificante.</p> <p><b>Dosis</b> 25 g de cultivo para 100 kg de carne</p> <p><b>Instrucciones de uso</b> Adición al picado de carne el contenido del sobre se debe añadir directamente a la cutter al principio del proceso junto con los ingredientes secos.</p>		
<b>Propiedades Físicas</b>	<b>Color:</b>	Blanco a marrón	
	<b>Aspecto Físico:</b>	Polvo, granulado	
	<b>Solubilidad:</b>	Suspensión hidro-soluble	
<b>Envase</b>	<b>No Material:</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Tipo</b>
	502360	50X25 G	Sobre (s) en caja
<b>Almacenaje y manipulación</b>	<b>Temperatura:</b>	< -17 °C / < 1 °F.	
	<b>Condiciones:</b>	Seco	

[www.chr-hansen.com](http://www.chr-hansen.com)

Página: 1 (3)

*La información aquí contenida es según nuestro conocimiento verdadera y correcta, y presentada de buena fe. Puede sufrir modificaciones sin previo aviso. Ninguna garantía contra infrincimiento a patentes está implícita o inferida. Esta información es ofrecida solamente para su consideración y verificación. Copyright© Chr. Hansen A/S. Todos los derechos reservados.*

## S-B-61 Bactoferm®

Información de Producto

Versión: 1 PI-EU-ES 20-09-2007

### CHR HANSEN

#### Vida útil

Para cultivos liofilizados, al menos 18 meses cuando se almacena según las recomendaciones.

Al almacenarse a +5°C/ 41°F, la vida útil es de al menos 6 semanas.

#### Información técnica

##### Datos fisiológicos

Composición del cultivo	<i>Staphylococcus carnosus</i>
Temperatura de crecimiento	
Ópt/máx/min	30°C/45°C/10°C (86°F/113°F/50°F)
Límite de sal	16% de sal en agua
Características	Anaeróbico facultativo Catalasa positiva Nitrato reductasa positiva Lipolítica Proteolítica
Azúcares fermentables	
Glucosa (dextrosa)	+
Fructosa	+
Maltosa	+
Lactosa	+
Sacarosa (sucrosa)	+
Almidón	-

##### Métodos analíticos

Referencias y métodos analíticos están disponibles bajo petición.

#### Legislación

Los cultivos de Chr. Hansen cumplen con las estipulaciones sobre seguridad alimentaria establecidas en el Reglamento 178/2002/EC. Las bacterias ácido lácticas generalmente se reconocen como seguras y se pueden utilizar en alimentación. Sin embargo, para aplicaciones específicas, recomendamos que consulte la legislación nacional.

El producto está destinado para uso alimentario

[www.chr-hansen.com](http://www.chr-hansen.com)

Página: 2 (3)

La información aquí contenida es según nuestro conocimiento verdadera y correcta, y presentada de buena fe. Puede sufrir modificaciones sin previo aviso. Ninguna garantía contra infrincimiento a patentes está implícita o inferida. Esta información es ofrecida solamente para su consideración y verificación. Copyright© Chr. Hansen A/S. Todos los derechos reservados.

**S-B-61 Bactoferm®**

Información de Producto

Versión: 1 PI-EU-ES 20-09-2007

**CHR HANSEN**

<b>Seguridad alimentaria.</b>	No implica garantía de seguridad alimentaria si el producto se utiliza en aplicaciones diferentes de las descritas anteriormente. Si desea utilizar el producto en otra aplicación, por favor, contacte con el personal técnico de Chr. Hansen.
<b>Ingredientes</b>	Véase la etiqueta de la caja.
<b>Etiquetaje</b>	Etiquetaje sugerido "cultivo ácido láctico" o "cultivo de arranque". Sin embargo, ya que la legislación puede variar, por favor, consulte las leyes locales.
<b>Marcas comerciales</b>	Las marcas que aparecen en este documento pueden no estar registradas en su país, aun si poseen el signo ®. Las marcas son propiedad de Chr Hansen o usadas bajo licencia.
<b>Servicio técnico</b>	Personal de los Laboratorios de Aplicación y Desarrollo de Productos de Chr Hansen están a su disposición si necesita más información.



[www.chr-hansen.com](http://www.chr-hansen.com)

Página: 3 (3)

*La información aquí contenida es según nuestro conocimiento verdadera y correcta, y presentada de buena fe. Puede sufrir modificaciones sin previo aviso. Ninguna garantía contra infrincimiento a patentes está implícita o inferida. Esta información es ofrecida solamente para su consideración y verificación. Copyright© Chr. Hansen A/S. Todos los derechos reservados.*