

UNIVERSIDAD DE CORDOBA
FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

**EMPLEO DE FERMENTOS LÁCTICOS EN LA
FABRICACIÓN DE PRODUCTOS CÁRNICOS**

CARMEN M^a MATA ANGUIANO

CORDOBA, 1999

EMPLEO DE FERMENTOS LÁCTICOS EN LA FABRICACIÓN DE PRODUCTOS CÁRNICOS

Memoria presentada por la Licenciada
Carmen M^a Mata Anguiano para optar
al grado de Doctor en Veterinaria.

Carmen M^a Mata Anguiano

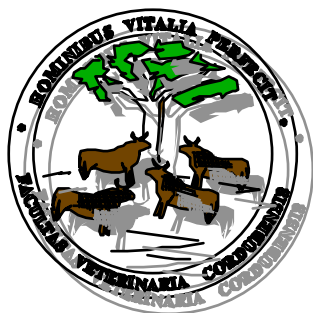
V^oB^o
El Director

V^oB^o
El Director

José Fernández-Salguero Carretero

Rafael Gómez Díaz

Córdoba a 2 de Diciembre de 1999



JOSÉ FERNÁNDEZ-SALGUERO CARRETERO, catedrático de Tecnología de Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba y **RAFAEL GÓMEZ DÍAZ**, profesor asociado del Departamento de Bromatología y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Córdoba

INFORMAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Empleo de fermentos lácticos en la fabricación de productos cárnicos**”, de la que es autora la Licenciada en Veterinaria D^a Carmen María Mata Anguiano, ha sido realizada en el Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos bajo nuestra dirección y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos el presente informe en Córdoba a 2 de Diciembre de 1999.

José Fernández-Salguero Carretero

Rafael Gómez Díaz

A mis padres

Knowledge dwells
In heads replete with thoughts of other men;
Wisdom in minds attentive to their own.

Willian Cowper
The Winter Walk at Noon.

El conocimiento habita
en cabezas repletas de pensamientos de otros hombres;
la sabiduría en mentes atentas a sí mismas.

(Mi traducción)

Agradecimientos

Deseo agradecer de la forma más sincera a todas aquellas personas y entidades que de una manera u otra han contribuido a la consecución de este trabajo:

A los profesores D. José Fernández-Salguero Carretero y D. Rafael Gómez Díaz, los directores de esta tesis, por la confianza mostrada en mi trabajo y por poner a mi disposición los medios necesarios para la realización del mismo.

A la Dr. D^a M^a Teresa del Cuvillo Palomino, Responsable de Calidad de la empresa PROANDA, S.L. Su orientación y apoyo en todo momento fueron fundamentales, no sólo en las fases iniciales de este proyecto, sino en la consecución final del mismo.

A todos los directivos y trabajadores de la empresa PROANDA S.L., que me acogieron como un miembro más, y pusieron a mi disposición todos los recursos técnicos y humanos para la elaboración de las muestras de esta Tesis.

A Luis, que en todo momento constituyó la fuerza principal para llevar a cabo este proyecto. Su apoyo, su cariño y su comprensión han sido los ejes, físicos y psíquicos, en los que se ha basado la elaboración de esta tesis. Muchos de los aciertos de los que este trabajo se precia se deben, en gran parte, a su sabio entendimiento.

A Mamen, Pepe, Montse, Emilia y Luis, amigos y compañeros, por su ayuda y ánimo en todo momento. Y a todas las personas del Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos por los años que hemos compartido juntos.

Al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión de la Beca de Formación del Personal Investigador de la cual he disfrutado durante este tiempo. Y al Grupo de Investigación AGR0120 “Lactología y Tecnología de la Carne” del Plan Andaluz de Investigación (PAI) por su aportación a la financiación de la parte experimental de este trabajo.

A todos, Gracias.

Agradecimientos

Deseo agradecer de la forma más sincera a todas aquellas personas y entidades que de una manera u otra han contribuido a la consecución de este trabajo:

A los profesores D. José Fernández-Salguero Carretero y D. Rafael Gómez Díaz, los directores de esta tesis, por la confianza mostrada en mi trabajo y por poner a mi disposición los medios necesarios para la realización del mismo.

A la Dr. D^a M^a Teresa del Cuvillo Palomino, Responsable de Calidad de la empresa PROANDA, S.L. Su orientación y apoyo en todo momento fueron fundamentales, no sólo en las fases iniciales de este proyecto, sino en la consecución final del mismo.

A todos los directivos y trabajadores de la empresa PROANDA S.L., que me acogieron como un miembro más, y pusieron a mi disposición todos los recursos técnicos y humanos para la elaboración de las muestras de esta Tesis.

A Luis, que en todo momento constituyó la fuerza principal para llevar a cabo este proyecto. Su apoyo, su cariño y su comprensión han sido los ejes, físicos y psíquicos, en los que se ha basado la elaboración de esta tesis. Muchos de los aciertos de los que este trabajo se precia se deben, en gran parte, a su sabio entendimiento.

A Mamen, Pepe, Montse, Emilia y Luis, amigos y compañeros, por su ayuda y ánimo en todo momento. Y a todas las personas del Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos por los años que hemos compartido juntos.

Al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión de la Beca de Formación del Personal Investigador de la cual he disfrutado durante este tiempo. Y al Grupo de Investigación AGR0120 “Lactología y Tecnología de la Carne” del Plan Andaluz de Investigación (PAI) por su aportación a la financiación de la parte experimental de este trabajo.

A todos, Gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE

I. <u>INTRODUCCIÓN</u>	3
I. 1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS	3
I. 2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS EMBUTIDOS CRUDOS CURADOS	6
I. 2. 1. Clasificación	6
I. 3. PROCESO DE ELABORACIÓN	9
I. 3. 1. Selección de materias primas	9
I. 3. 2. Preparación de la mezcla y embutido	14
I. 3. 3. Estufaje, desecación y/o ahumado	15
I. 3. 4. Cultivos iniciadores utilizados en la industria cárnica	17
I. 3. 4. 1. <u>Microorganismos que componen los cultivos iniciadores</u>	19
I. 3. 4. 2. <u>Requisitos específicos de los cultivos iniciadores</u>	20
I. 3. 4. 2. 1. Bacterias ácido lácticas	20
I. 3. 4. 2. 2. Micrococaceas	23
I. 3. 4. 3 <u>Efectos inhibidores de los cultivos lácticos</u>	24
I. 3. 4. 4. <u>Situación actual y nuevos avances</u>	28
I. 3. 5. Bioconservadores	30
I. 4. PROCESO DE MADURACIÓN DE LOS EMBUTIDOS CRUDOS CURADOS	34
I. 4. 1. Modificaciones Bioquímicas	34
I. 4. 1. 1. <u>Cambios en los hidratos de carbono</u>	34
I. 4. 1. 2. <u>Cambios en los compuestos nitrogenados</u>	37
I. 4. 1. 3. <u>Cambios en los compuestos lipídicos</u>	45
I. 4. 2. Modificaciones Físico-Químicas	57
I. 4. 2. 1. <u>Cambios en el pH</u>	57

I. 4. 2. 2. <u>Cambios en la actividad de agua (a_w)</u>	60
I. 4. 2. 3. <u>Consistencia</u>	61
I. 4. 2. 4. <u>Desarrollo del color</u>	63
I. 4. 3. Modificaciones Microbiológicas	74
I. 4. 3. 1. <u>Evolución de los principales grupos microbianos</u>	74
I. 4. 3. 2. <u>Riesgos higiénicos en los embutidos crudos curados</u>	77
I. 5. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	79
II. <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	83
II. 1. MATERIAL	83
II. 1. 1. Material general de laboratorio	83
II. 1. 2. Material experimental	84
II. 2. MÉTODOS	86
II. 2. 1. Elaboración de los embutidos	86
II. 2. 2. Métodos para análisis microbiológico	88
II. 2. 2. 1. <u>Preparación de muestras y diluciones</u>	88
II. 2. 2. 2. <u>Enumeración de bacterias aerobias mesófilas</u>	88
II. 2. 2. 3. <u>Determinación de la flora láctica</u>	89
II. 2. 2. 4. <u>Enumeración de micrococos</u>	91
II. 2. 2. 5. <u>Enumeración de <i>Staphylococcus aureus</i> y estafilococos no patógenos</u>	92
II. 2. 2. 6. <u>Enumeración de enterobacteriaceas totales</u>	93
II. 2. 2. 7. <u>Enumeración de coliformes totales</u>	94
II. 2. 2. 8. <u>Enumeración de <i>Escherichia coli</i></u>	94
II. 2. 2. 9. <u>Presencia de <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i></u>	95
II. 2. 2. 10. <u>Presencia de <i>Listeria monocytogenes</i></u>	96
II. 2. 2. 11. <u>Enumeración de enterococos (grupo D de Lancefield)</u>	96
II. 2. 2. 12. <u>Enumeración de levaduras y mohos</u>	97

II. 2. 2. 13. <u>Cálculo de la velocidad de muerte microbiana</u>	97
II. 2. 3. Métodos para análisis físico-químico	97
II. 2. 3. 1. <u>Determinación de la humedad</u>	97
II. 2. 3. 2. <u>Determinación del pH</u>	98
II. 2. 3. 3. <u>Determinación de las cenizas</u>	98
II. 2. 3. 4. <u>Determinación de la actividad de agua (a_w)</u>	98
II. 2. 3. 5. <u>Control de mermas</u>	99
II. 2. 3. 6. <u>Determinación de cloruros</u>	99
II. 2. 3. 7. <u>Determinación de nitritos</u>	100
II. 2. 3. 8. <u>Determinación de nitrógeno no proteico</u>	101
II. 2. 3. 9. <u>Determinación de proteínas</u>	102
II. 2. 3. 10. <u>Determinación de grasa</u>	104
II. 2. 3. 11. <u>Determinación del índice de peróxidos</u>	104
II. 2. 3. 12. <u>Determinación del índice del TBA</u>	106
II. 2. 3. 13. <u>Determinación de la acidez titulable (expresado como porcentaje de ácido láctico)</u>	107
II. 2. 4. Evaluación de los atributos sensoriales	108
II. 2. 5. Tratamiento estadístico de los resultados	109
III. <u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>	113
III. 1. COMPOSICIÓN QUÍMICA BRUTA	113
III. 1. 1. Evolución de la humedad	113
III. 1. 2. Porcentaje de proteínas	119
III. 1. 3. Porcentaje de grasa	121
III. 1. 4. Porcentaje de cenizas	121
III. 1. 5. Cantidad de ácido láctico	122
III. 2. PARÁMETROS QUÍMICOS Y FISICO-QUÍMICOS	127
III. 2. 1. Evolución del pH	127
III. 2. 2. Cantidad de cloruro sódico	132

III. 2. 3. Evolución de la actividad de agua (a_w)	135
III. 2. 4. Cantidad de nitritos.....	140
III. 2. 5. Evolución del nitrógeno no proteico (NNP).....	143
III. 3. EVALUACIÓN DE LOS ÍNDICES DE OXIDACIÓN DE LA GRASA DURANTE LA MADURACIÓN.....	147
III. 3. 1. Evolución del índice de peróxidos.....	147
III. 3. 2. Evolución del índice del ácido tiobarbitúrico (TBA)	151
III. 4. EVOLUCIÓN DE LOS RECuentOS MICROBIOLÓGICOS.....	156
III. 4. 1. Recuento total.....	156
III. 4. 2. Flora láctica.....	160
III. 4. 3. Micrococos.....	166
III. 4. 4. Estafilococos	171
III. 4. 5. Enterobacterias.....	176
III. 4. 6. Coliformes.....	182
III. 4. 7. Enterococos (Streptococos del grupo D de Lancefield).....	187
III. 4. 8. <i>Staphylococcus aureus</i>	191
III. 4. 9. <i>Escherichia coli</i>	194
III. 4. 10. Levaduras y mohos.....	196
III. 4. 11. Otros microorganismos patógenos.....	199
III. 5. ANALISIS MULTIDIMENSIONAL	201
III. 5. 1. Análisis de Componentes Principales. Parámetros físico-químicos.....	201
III. 5. 2. Análisis de Componentes Principales. Parámetros Microbiológicos.....	202
III. 6. EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES.....	206
III. 6. 1. Percepciones visuales.....	206
III. 6. 1. 1. <u>Color</u>	206
III. 6. 1. 2. <u>Aspecto al corte</u>	207
III. 6. 1. 3. <u>Acortezamiento</u>	208

III. 6. 1. 4. <u>Facilidad de separación de la tripa</u>	208
III. 6. 2. Percepciones olfativas	212
III. 6. 2. 1. <u>Intensidad de olor</u>	212
III. 6. 2. 2. <u>Presencia de olores extraños</u>	215
III. 6. 3. Percepciones gustativas	217
III. 6. 3. 1. <u>Intensidad de sabor</u>	217
III. 6. 3. 2. <u>Sabor ácido</u>	219
III. 6. 3. 3. <u>Sabor picante</u>	221
III. 6. 3. 4. <u>Presencia de sabores extraños</u>	222
III. 6. 4. Percepciones hápticas y aceptabilidad general	223
III. 6. 4. 1. <u>Dureza</u>	223
III. 6. 4. 2. <u>Jugosidad</u>	225
III. 6. 4. 3. <u>Aceptabilidad general</u>	226
IV. <u>RESUMEN</u>	229
V. <u>CONCLUSIONES</u>	231
VI. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	235

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCION

I. 1. ANTECEDENTES HISTORICOS

La desecación de productos cárnicos representa la forma de conservación de la carne más antigua que se conoce. Desde hace miles de años el hombre ha troceado o picado la carne, la ha embutido en tripa natural y la ha desecado consiguiendo un producto estable microbiológicamente y con unas características sensoriales muy particulares que puede conservarse durante varios meses.

Algunos autores, como Adams (1986), afirman que el origen de la producción de los embutidos reside en los países de la cuenca Mediterránea aunque existen referencias sobre la elaboración de embutidos de carne de cerdo en China hace 2.000 años. Pederson (1979) afirma que el nombre de salami podría derivarse de la ciudad de Salamis en la costa este de Chipre aunque también sugiere que la palabra embutido se origina del latín “salsus” que etimológicamente significa carne embutida conservada por salazón. Por otro lado, Liepe (1983) se opone a esta idea y defiende que el nombre se origina de la palabra italiana “sale”, que significa sal. También los romanos conocían el embutido crudo y salado al que llamaban "salsicia" o "farta salsicia" de donde provienen etimológicamente las palabras salchicha y, por su mayor calibre o grosor, salchichón. Es probable que los embutidos españoles procedan del trasvase político y cultural que se produjo en los siglos finales del Imperio Romano, cuando los pueblos centroeuropeos se fundieron con los de la Península Ibérica. De la Edad Media española procede un manuscrito de la época arábigo andalusí sobre la cocina hispano magrebí, que recoge una serie de recetas en las que se refiere a los embutidos, longanizas, albóndigas, carnes picadas y pasteles de carne elaborados con diversas especias (Marcos, 1991).

En América estos productos también gozan de gran difusión y tradición, según Leistner (1986a) fueron los emigrantes europeos los que establecieron la producción allí, y no existe información anterior sobre este tipo de alimentos. Estas influencias europeas también se experimentaron en Australia, Seychelles, Filipinas y Papua Nueva Guinea.

En España existe una extensa gama de embutidos curados con características muy diferentes según los hábitos y costumbres de las distintas regiones. Según la Asociación de Industrias de la Carne de España (AICE), su producción representa el 18 % del volumen total de elaborados cárnicos que en 1997 fue de 156.687 Tm. En la Tabla 1 se recoge la producción de elaborados cárnicos en España en los últimos años, como puede observarse la producción de embutidos ha experimentado un claro estancamiento, según Flores (1994) se debe a varias causas, entre ellas, el incremento de los precios de venta, la competencia de otros productos alternativos más económicos, las recomendaciones dietéticas a favor de productos hipocalóricos y la pérdida gradual de sus características sensoriales típicas, como consecuencia de la implantación en las industrias de técnicas de curado rápido.

La conservación de estos productos se debe a la combinación de un proceso de fermentación con otro de deshidratación. Hasta hace 50 años se conocía muy poco sobre los cambios que se producían en la masa cárnica una vez que era embutida, pero con la llegada de la producción a gran escala el fabricante necesitaba estandarizar el producto, disminuir los costes y reducir los tiempos de maduración. Fue a principios de los años 50 cuando en Europa los investigadores comenzaron a estudiar la tecnología y los cambios físicos y bioquímicos que se producían durante el proceso de fermentación y desecación en los embutidos crudos curados.

Tabla 1.- Producción de elaborados cárnicos (Tm.) según AICE (1999).

Producto:	1992	1993	1994	1995	1996	1997
Jamón y paleta curados	180.050	181.500	187.308	183.955	181.560	182.337
Embutidos curados	166.350	163.120	166.546	162.715	156.530	156.687
Jamón y paleta cocidos	139.950	137.700	140.041	132.198	125.984	125.606
Otros tratados por el calor	259.810	260.300	265.766	252.743	241.370	242.094
Productos adobados y frescos	125.820	126.230	129.007	129.652	126.670	127.113
Platos preparados	45.654	44.610	45.725	46.045	44.200	44.377
TOTAL:	917.634	913.460	934.393	907.308	876.314	880.251

En 1971, Coretti utiliza el término “maduración” para referirse a todos los cambios físicos, químicos, microbiológicos y enzimáticos que suceden en el embutido bajo unas condiciones de temperatura y humedad relativa controladas.

Tradicionalmente se confiaba en una “fermentación natural”, sin embargo la producción a gran escala obligó a estandarizar los procesos para evitar posibles defectos. La inoculación de microorganismos para dirigir las fermentaciones había sido una práctica habitual en otros sectores de la industria alimentaria, como el lácteo, pero en la industria cárnica no se inició hasta la década de los 40. Las ventajas que reportó esta técnica fueron: períodos de maduración más cortos, uniformidad de la producción reduciendo la presencia de piezas defectuosas y mejora de las características sensoriales de los productos.

Otro aspecto de gran importancia en la utilización tecnológica de cultivos iniciadores es su contribución a la seguridad e higiene de los alimentos. Es bien conocido que las bacterias ácido lácticas producen una serie de sustancias antagonistas de otros grupos microbianos, que incluye productos finales del metabolismo como son ácidos orgánicos (láctico, acético y propiónico), peróxido de hidrógeno y diacetilo; así como otras sustancias de naturaleza antibiótica denominadas bacteriocinas. Algunos investigadores apuntaron la posibilidad de conservar los alimentos mediante la adición de cultivos iniciadores o por la incorporación de los metabolitos antimicrobianos producidos por las bacterias lácticas (Speck, 1972).

La aplicación de esta técnica con la finalidad exclusiva de conservar e incrementar la vida comercial de los alimentos abre las puertas a un nuevo concepto en la conservación alimentaria denominado bioconservación y se presenta como una alternativa a los conservantes tradicionales que permitiría reducir las dosis de éstos que se añaden actualmente para la conservación de embutidos crudos curados (Daeschel, 1989; Schoebitz *et al.*, 1995; Huis in't Veld, 1996).

I. 2. CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS EMBUTIDOS CRUDOS CURADOS

I. 2. 1. Clasificación

Los embutidos crudos curados son productos que se elaboran con carne y grasa animal picadas a las que se añaden sales, especias y aditivos autorizados; los cuales son mezclados y embutidos en tripas naturales o artificiales y sometidos a un proceso de desecación durante el cual tiene lugar una fermentación microbiana que origina la acidificación del producto.

Estos productos se caracterizan porque se consumen crudos, se conservan sin necesidad de refrigeración y tienen un tiempo de vida útil muy largo. Además poseen unas características organolépticas muy apreciables, destacando su color rojo, consistencia, aroma y sabor típicos.

No obstante, la elaboración de embutidos fermentados varía sustancialmente de unos países a otros e incluso existen diferencias entre regiones dentro del mismo país. Esto se debe básicamente a variaciones en la composición de los embutidos y a la tecnología de elaboración. Según Leistner (1986b), la producción de embutidos fermentados crudos curados involucra una tecnología imprecisa que permite grandes variaciones siempre que se mantenga el concepto básico de proporcionar una adecuada reducción del pH y/o de la actividad de agua (a_w), además afirma que deben cometerse graves errores en la fabricación para que se obtengan productos defectuosos.

A pesar de la gran variedad de productos distintos autores han intentado clasificarlos. Lücke (1985) propone la clasificación que se muestra en la Tabla 2 y define cuatro tipos de embutidos en función del porcentaje de pérdidas de peso que sufre el producto durante la maduración, asimismo afirma que los avances en las técnicas de procesado de la carne y de refrigeración están favoreciendo que aparezcan nuevos tipos de embutidos fermentados.

La clasificación de embutidos propuesta por Roca e Incze (1990), Tabla 3, 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 salchichón españoles.

Tabla 2.- Clasificación de embutidos fermentados (según Lücke, 1985).

Tipo de producto	Perdidas de peso durante la desecación*	Ahumado	Crecimiento de mohos y levaduras
Embutido seco	>30 %	no**	sí
Ahumado	>20 %	sí	no
Embutido semi-seco	<20 %	si	no
Embutido fermentado untable no desecado	<10 %	generalmente	no

* Aproximadamente

** O sólo ligeramente ahumado durante la fermentación

Tabla 3.- Clasificación de embutidos fermentados (según Roca y Incze, 1990).

Tipo de producto	Período de fermentación	Contenido final de agua	Valor final de a_w
Spreadable (untable)	3-5 días	34-42 %	0.95-0.96
Sliceable (loncheable)			
Maduración corta	1-4 semanas	30-40 %	0.92-0.94
Maduración larga	12-14 semanas	20-30 %	0.85-0.86

En la clasificación que propone Adams (1986) los embutidos se dividen en dos categorías: secos y semisecos o de nueva generación en función de las pérdidas de peso ocurridas durante la maduración. Posteriormente Zeuthen (1995) propuso un sistema de clasificación (Tabla 4), 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).

Tabla 4. Tipos de embutidos fermentados (modificado por Zeuthen, 1995 de Adams, 1986).

Tipo	Pérdida de peso (%)	Contenido de agua (%)	Relación agua/proteína
Seco	25-50	25-45	2,3:1
Semiseco			
Medio	30	50	2,3-3,7:1
Nueva generación	20		
No desecados (untables)	10		

I. 3. PROCESO DE ELABORACIÓN

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.

La elaboración de embutidos crudos curados se puede resumir en tres etapas básicas que abarcan las distintas fases del proceso, y que incluiría selección de materias primas, preparación de la mezcla y embutido, y por último estufaje, desecación y/o ahumado.

I. 3.1. Selección de materias primas.

- Carne y grasa.

La calidad de las materias primas y la higiene del proceso son de vital importancia. La carne que se utiliza normalmente para la elaboración de estos productos es de cerdo, ternera y/o pollo, aunque en algunas regiones también se utiliza el pato, conejo o caballo. Esta carne debe reunir unos requisitos básicos para su empleo en la elaboración de embutidos: debe ser carne sana libre de coágulos de sangre y con un valor de pH entre 5,6-6,0 y no superior a 6,2 (en la

carne de cerdo), no se aconseja utilizar carnes DFD (dry, firm, dark) ni PSE (pale, soft, exudative) y la carne debe estar bien refrigerada ó en caliente.

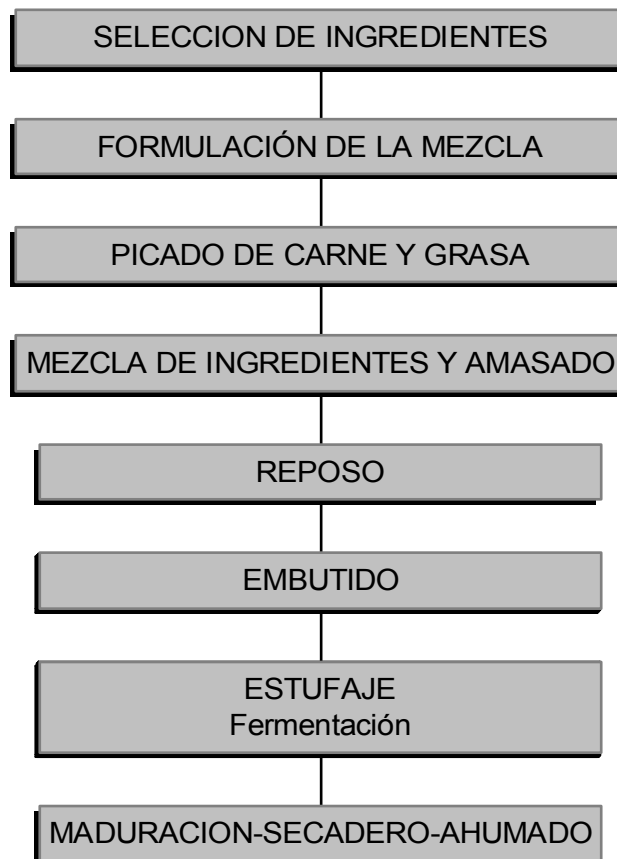


Figura 1. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de embutidos curados curados.

La grasa es otro ingrediente fundamental ya que influye sobre determinadas características que afectan de forma decisiva a la calidad sensorial del embutido, como son: facilidad al corte, jugosidad y untuosidad. Además participa en el aroma y sabor del embutido y aporta ligazón, puesto que favorece la formación de la emulsión de los componentes de la masa. Generalmente suele utilizarse grasa animal y preferentemente de cerdo, es conveniente seleccionar

grasa con alto grado de saturación para prevenir los defectos de enranciamiento, por lo que es recomendable emplear grasas de depósito dorsal o de panceta.

- Ingredientes del curado.

El tipo de aditivos que se añaden en la elaboración de embutidos varía mucho entre países y es otra de las causas que explican la amplia variedad de estos productos. Los aditivos son sustancias que, aunque no son necesarias para la fabricación de los embutidos, regulan la maduración, aumentan la calidad microbiológica, modifican las características organolépticas e incrementan el período de conservación de los productos. La calidad final es debida, en gran parte, a la calidad de las especias y condimentos utilizados, aunque a veces, pueden afectar negativamente al producto ya que aportan una carga microbiana que puede modificar el curso de las transformaciones microbiológicas que se producen durante la maduración del embutido.

Los condimentos se añaden a la masa cárnica principalmente por su acción sazonzadora y aromática. Los productos crudos curados requieren unos condimentos específicos del curado donde se incluyen la sal, los nitratos y nitritos y los azúcares. En cuanto a las especias, su función es básicamente aromática y su empleo varía según el tipo de producto pero, en general, las más utilizadas son: pimentón, ajo, clavo, nuez moscada, cilantro, cebolla, orégano, pimienta y tomillo.

La sal común se ha utilizado tradicionalmente como saborizante y por su acción conservadora, ya que su adición provoca una disminución de la actividad de agua del producto que inhibe el desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes. Además es imprescindible para lograr la ligazón de estos embutidos puesto que favorece la solubilización de las proteínas miofibrilares de la carne que permitirá la formación de un gel estable y consistente.

El nitrato y nitrito juegan un papel fundamental en el desarrollo del color típico de los embutidos crudos. Fue a principios de siglo cuando se atribuyó el color rojo de estos productos a la presencia de los nitratos de sodio y potasio presentes en las sales no purificadas utilizadas en el curado. El proceso de enrojecimiento de las carnes curadas comprende una serie de complejas reacciones químicas y enzimáticas en las que participan activamente microorganismos, principalmente pertenecientes a la familia *Micrococcaceae*, que reducen el nitrato a nitrito. Este nitrito se reduce posteriormente a óxido nítrico que se combina con la mioglobina para formar nitrosomioglobina o pigmento rojo del curado. El proceso de enrojecimiento se contemplará más profundamente en el apartado I.4.2.4. 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 bactericida sobre el crecimiento de determinados microorganismos sensibles como *Salmonella*. No obstante, algunos investigadores sugieren que la cantidad de nitrito utilizada en los embutidos crudos curados (120-150 ppm) por sí sola, no inhibe el crecimiento de *Salmonella* spp., *Clostridium botulinum* ni *Staphylococcus aureus*, aunque sí es efectiva cuando se combina con otros factores como valores reducidos de a_w y pH (Lücke, 1985).

Los azúcares constituyen otro ingrediente básico en la elaboración de embutidos crudos curados, se consideran agentes auxiliares del curado y son el principal sustrato energético de los microorganismos que intervienen en el proceso de acidificación. Las bacterias ácido lácticas homofermentativas desdoblan los azúcares produciendo ácido láctico que reduce el pH de la masa cárnica a valores inferiores a 5,5. Este 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.

La cantidad y el tipo de azúcar añadido dependen del tipo de producto crudo 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 (Prändl *et al.*, 1994), no obstante hay que considerar la capacidad amortiguadora de las proteínas cárnicas que reducen el pH final. Es muy importante ajustar correctamente la dosis de azúcar añadida ya que pueden producirse defectos de sobreacidificación, producción de gas y presencia de sabores extraños en el producto final. Los azúcares más utilizados en la elaboración de productos crudos curados son: glucosa, fructosa, sacarosa y lactosa, aunque también se utilizan hidrolizados de almidón desecado.

En ocasiones para acelerar el proceso de acidificación de la masa cárnica se utilizan reguladores de pH como la glucono-delta-lactona, que es un producto de transformación de la glucosa que añadido a la masa cárnica origina un descenso más rápido e intenso del pH. Su empleo acelera el enrojecimiento y ligazón de la masa embutida, y además contribuye a la estabilidad del color y del pH. No obstante, si la acidificación se produce rápidamente puede originar defectos de consistencia ya que no da tiempo a que se forme el gel y el producto no adquiere una correcta ligazón.

- Reguladores de la maduración.

Dentro de este grupo se incluyen los cultivos iniciadores y los bioconservadores.

Los cultivos iniciadores, según la definición de Leistner y Echardt (1979), son microorganismos que se presentan en estado puro o mixto, seleccionados de acuerdo con sus propiedades específicas y que se agregan a los alimentos con

objeto de mejorar su aspecto, aroma y sabor, así como la conservación de los mismos. Hoy día su empleo es generalizado en la industria cárnica permitiendo homogeneizar la producción y evitar posibles defectos.

Los bioconservadores son productos derivados de la fermentación de las bacterias lácticas que contienen los metabolitos producidos por éstas durante su crecimiento, incluyendo sustancias antimicrobianas con acción inhibidora sobre otros microorganismos. Estos productos se presentan como una alternativa a los conservantes tradicionales, ya que incrementan la seguridad de los alimentos e incluso pueden prolongar su vida comercial (Monfort, 1994; Stiles, 1996). Su uso está comenzando a extenderse en la industria cárnica y son muchos los nuevos productos de este tipo que están apareciendo en el mercado aunque aún no existe una Normativa legal para ellos.

Los tipos de cultivos y bioconservadores que se utilizan en la industria y su acción sobre los embutidos crudos curados se tratará en los capítulos I.3.4 y I.3.5.

I. 3. 2. Preparación de la mezcla y embutido.

La preparación de la mezcla incluye las operaciones de picado y amasado de la carne y grasa con el resto de ingredientes. El picado puede realizarse en una picadora o en una cutter (si se desea un picado más fino) y para evitar fenómenos de embarrado es aconsejable que se lleve a cabo a una temperatura de 0° C o incluso menor. 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 a vacío. La masa cárnica ya elaborada se deja reposar en refrigeración durante 18-24 horas, después de lo cual se embute.

El embutido puede realizarse en tripa natural o artificial. Las tripas naturales se han utilizado tradicionalmente empleando tracto intestinal de ovino,

porcino y vacuno, sin embargo, el proceso de obtención y preparación de la tripa es muy laborioso por lo que son más costosas que las artificiales y generalmente sólo se utilizan para productos de mayor calidad como el lomo embutido. Las tripas artificiales de celulosa o colágeno son las más empleadas, aunque para productos cárnicos cocidos suelen usarse tripas plásticas compuestas por una mezcla de poliamida, poliéster, polietileno y cloruro de polivinilo.

En la elaboración tradicional solían emplearse embutidoras discontinuas de pistón, pero las más utilizadas actualmente son las embutidoras continuas a vacío que evitan la presencia de aire en la masa reduciendo considerablemente la posibilidad de que aparezcan defectos de aspecto y consistencia en el producto. Durante la operación de embutido es recomendable que la temperatura de la masa cárnica no sea superior a 1° ó 2° C para evitar fenómenos de embarrado.

I. 3. 3. Estufaje, desecación y/o ahumado.

Una vez embutidas las piezas son conducidas a secaderos donde se lleva a cabo una maduración natural o bien pueden madurarse en cámaras climáticas que permiten controlar las condiciones de temperatura y humedad relativa del ambiente, así como la velocidad del aire.

La técnica natural requiere largos períodos de maduración (maduración lenta) donde las temperaturas óptimas deben oscilar entre 12 y 14° C y la humedad relativa debe ser de un 80 %. Este procedimiento sólo es posible realizarlo en los países ó áreas centroeuropeas durante los meses que el clima lo permita.

Las cámaras climáticas son la opción más utilizada actualmente ya que permiten controlar los factores de humedad relativa y temperatura de forma que puede homogeneizarse la producción y evitar muchos defectos de maduración. La maduración de los embutidos crudos curados en estas cámaras, generalmente, consta de dos fases: estufaje y desecación o maduración propiamente dicha.

Durante el estufaje las piezas recién embutidas se someten a temperaturas entre 22-26° C y a una humedad relativa de 90 %, aproximadamente. Esta fase es crucial para el buen desarrollo de la maduración ya que se producen importantes cambios físico-químicos y microbiológicos como consecuencia del proceso fermentativo iniciado por las bacterias lácticas, que provocan la acidificación del producto, y las *Micrococcaceas*, que durante las primeras 24 horas llevan a cabo la reducción de los nitratos a nitritos iniciando el fenómeno de enrojecimiento.

En la desecación o maduración propiamente se modifican las condiciones de temperatura y humedad relativa. El proceso puede realizarse a temperatura baja (inferior a 15° C), intermedia ó alta (superior a 20° C y hasta 28-30° C) y con una humedad relativa entre 75-85 %. Es muy importante que se controle adecuadamente la velocidad y distribución del aire en los secaderos, ya que durante esta fase se va a producir la mayor parte de la deshidratación del producto y es conveniente que este proceso se desarrolle de forma gradual en equilibrio con el resto de modificaciones que se producen en el embutido.

La correcta desecación del embutido depende de varios factores entre los que cabe destacar:

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

En España y algunos países centroeuropeos, especialmente en Alemania, los embutidos crudos son sometidos a un proceso de ahumado. El humo proporciona un aroma y sabor característicos además de prevenir el crecimiento de microorganismos indeseables, aunque la exposición al humo no debe impedir el desarrollo normal de la fermentación microbiana en el embutido. En España el

ahumado se utiliza en productos cárnicos cocidos, simultáneamente con el tratamiento térmico, y preferentemente en piezas grandes como el jamón y la paleta de cerdo.

I. 3.4. Cultivos iniciadores utilizados en la industria cárnica

La utilización de cultivos iniciadores en la industria cárnica está ampliamente difundida. Como se ha definido previamente, son microorganismos que se añaden a la carne con el fin de controlar adecuadamente el proceso de fermentación y maduración de los embutidos crudos curados de forma que se consiga estandarizar el proceso y la calidad de los productos elaborados. Los microorganismos añadidos se instauran como flora predominante dirigiendo la fermentación y excluyendo a la flora indeseable, así se reducen los riesgos higiénicos y de fabricación por deficiencias de origen microbiano.

En la elaboración tradicional se confía en una “fermentación natural” en la cual las condiciones predominantes en el embutido favorecen el crecimiento selectivo de la flora microbiana adaptada que generalmente está compuesta por bacterias ácido lácticas y micrococos. Una forma de asegurar que esta flora beneficiosa esté presente consiste en inocular una porción de carne fermentada previamente a la masa fresca, con lo cual se consiguen productos de mayor consistencia y estabilidad. Esta práctica ha sido utilizada durante muchos años con éxito pero en 1940, Jensen y Padock investigaron la posibilidad de utilizar una cepa de *Lactobacillus* en la elaboración de embutidos crudos curados.

Esta experiencia despertó el interés de otros investigadores que iniciaron un estudio más profundo sobre los cultivos iniciadores y su aplicación a la industria cárnica. Se establecieron dos líneas de investigación: de un lado científicos norteamericanos (Niven *et al.*, 1954; Deibel, 1956) recomendaron especialmente el empleo de *Pediococcus cerevisiae* para la elaboración de embutidos crudos curados. Por otro lado, científicos europeos (Niinivaara, 1955;

Pohja, 1960) estudiaron la utilización de cepas de micrococos estableciendo las ventajas tecnológicas que conllevaba su uso. Posteriormente Nurmi (1966) combinó ambos tipos de microorganismos, bacterias ácido lácticas y micrococos, en cultivos mixtos, obteniendo resultados más satisfactorios que cuando se empleaban independientemente.

El primer cultivo iniciador que apareció en el mercado, con aplicación en la industria cárnica, fue una cepa de *Pediococcus cerevisiae* (Niven *et al.*, 1959) 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* (Niinivara *et al.*, 1964) suministrada por la compañía Rudolf Müller y en 1966 aparece por primera vez un cultivo iniciador que combina *Lactobacillus plantarum* con una cepa de micrococos (Nurmi, 1966). 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.

Sin embargo el hecho de que puedan obtenerse embutidos crudos curados de excelente calidad sin la adición de cultivos iniciadores ha originado que su utilización en la industria cárnica no se haya desarrollado ampliamente hasta la década de los 80 (Jessen, 1995). Hoy día se consideran un componente más entre los ingredientes de los embutidos, existiendo en el mercado una amplia gama de estos productos que cubren las necesidades tecnológicas de los fabricantes.

I. 3. 4.1. 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 lácticas y las micrococáceas, se ha propuesto la utilización de otros géneros bacterianos como *Escherichia*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Corynebacterium* (Pätäja, 1977). 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 recogen en la Tabla 5.

Tabla 5.- Microorganismos usados como cultivos iniciadores para embutidos crudos curados (Hammes *et al.*, 1990).

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> <i>Micrococcus varians</i>
Levaduras	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Candida famata</i>
Mohos	<i>Penicillium nalgiovensis</i> , <i>Penicillium crysogenum</i>

Los cultivos iniciadores comerciales deben cumplir una serie de requisitos que son indispensables para que su aplicación genere los beneficios esperados. Estos requisitos se pueden agrupar en tres principios básicos: seguridad, competitividad tecnológica y viabilidad económica. En lo relativo a la seguridad,

los microorganismos utilizados como iniciadores no deben poseer actividad tóxica ni patógena y las preparaciones deben elaborarse con la máxima higiene y estar libres de cualquier tipo de contaminante, biológico o químico. Con respecto a las funciones tecnológicas, los microorganismos inoculados deben predominar sobre la flora espontánea de la masa cárnica y desarrollar su actividad metabólica. Finalmente, en cuanto a los aspectos económicos, el empleo del cultivo iniciador debe ser viable económicamente y su manipulación fácil; además el almacenamiento de los preparados en congelación o liofilización no debe afectar a las propiedades de la cepa ni ocasionar pérdidas de su actividad (Buckenhüskes, 1993).

I. 3. 4. 2. Requisitos específicos de los cultivos iniciadores.

I. 3. 4. 2. 1. Bacterias ácido lácticas

Las bacterias lácticas son un grupo de microorganismos muy heterogéneo que engloba cuatro géneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. De los cuales, los más utilizados para la elaboración de productos crudos curados son *Lactobacillus* y *Pediococcus*. 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. Los pediococos no suelen encontrarse como parte de la flora natural de los embutidos crudos pero su elevada resistencia al proceso de liofilización les ha convertido en uno de los géneros más utilizados en el mercado norteamericano (Hammes *et al.*, 1990).

La principal función tecnológica de las bacterias lácticas en los embutidos crudos curados se basa en su capacidad para producir ácido a partir de los carbohidratos añadidos a la masa. Los microorganismos utilizados como iniciadores son preferiblemente homofermentativos y descomponen los azúcares por la ruta de Embden-Meyerhof obteniendo ácido láctico como único producto

final (Kandler, 1983; Lücke y Hechelmann, 1987). Este ácido se acumula en el medio y como consecuencia origina una serie de efectos beneficiosos sobre el color, la textura y la conservación del embutido. Algunos autores (Hammes *et al.*, 1990) atribuyen cierta actividad nitrato y nitrito reductasa a determinadas especies de bacterias lácticas que también contribuiría en el proceso de enrojecimiento. Se ha demostrado que *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus pentosus* poseen enzimas nitrato y nitrito reductasa, mientras que *Pediococcus pentosaceus* sólo presenta actividad nitrito reductasa; otras especies como *Lactobacillus curvatus* y *Lactobacillus sake* carecen de ella o es muy escasa (Wolf y Hammes, 1988). Por otro lado, el pH ácido ejerce un potente efecto inhibitor del crecimiento de los microorganismos indeseables contribuyendo así a la conservación del embutido. No obstante, esta acción inhibitor no se puede explicar basándose únicamente en el factor pH, sino que probablemente se debe a la interacción de otros factores como la presencia de ácidos orgánicos, la presencia de peróxido de hidrógeno y la producción de bacteriocinas.

La aptitud de una cepa para ser un buen cultivo iniciador depende del tipo de producto que se desea fabricar y de las condiciones del procesado. Los preparados comerciales suelen incluir alguna de las siguientes especies: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus curvatus*, *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus pentosaceus*. Para que puedan desarrollar su función tecnológica deben estar presentes en la masa cárnica en un número superior a 10^6 ufc/g.

Los principales criterios que se siguen para la selección de la cepa iniciadora más adecuada dependen en gran parte del tipo de embutido que se va a fabricar y de los atributos que se desea obtener en el producto final. Una cualidad deseable es que la producción de ácido sea rápida al comienzo de la fermentación para inhibir el desarrollo de microorganismos indeseables, sin embargo, si la formación de ácido es excesiva puede dar lugar a defectos en el color y a la

presencia de gas en el embutido. La utilización de cepas con índice de producción de ácido muy incrementado sólo está indicado en casos muy concretos (Buckenhüskes, 1993).

La cepa seleccionada debe ser capaz de crecer a diferentes temperaturas y predominar durante todo el proceso de maduración. Es conveniente que establezca interacciones sinérgicas con otras bacterias componentes del cultivo iniciador, en cambio, debe presentar una acción antagónica hacia los microorganismos tecnológicamente indeseables y los patógenos. En este sentido, es importante seleccionar cepas que tengan capacidad para sintetizar bacteriocinas, ya que aunque su actuación esté limitada, pueden participar como un elemento secundario de inhibición junto a otros factores como el pH, la reducción de la a_w o la competencia por los nutrientes (Huis in't Veld, 1996).

La mayoría de los lactobacilos sintetizan peróxido de hidrógeno por la oxidación del lactato. Cuando es liberado a la masa cárnica puede ejercer cierta inhibición sobre microorganismos indeseables por su elevado poder oxidante, sin embargo, también actúa negativamente ya que puede ocasionar fenómenos de decoloración. Numerosas cepas de *Lactobacillus sake* y *Lactobacillus curvatus* presentan gran capacidad para formar rápidamente peróxido de hidrógeno; por tanto, las cepas elegidas para la industria cárnica no deben producir este metabolito, o bien, contener la enzima catalasa capaz de desdoblarlo.

Finalmente, otro aspecto tecnológico a tener en cuenta en la elección de la cepa es su posible participación en la formación del aroma. Distintos autores han defendido la actividad lipolítica y proteolítica que pueden desarrollar ciertas bacterias lácticas en los embutidos (Coretti, 1965; Reuter, 1975, El Soda *et al.*, 1986; Papon y Talon, 1988; Nielsen y Kemner, 1989) aunque existe gran controversia en torno a este tema.

I. 3. 4. 2. 2. Micrococáceas

Las micrococáceas son el segundo grupo de bacterias en importancia para la constitución de los cultivos iniciadores. Los dos géneros que incluye esta familia, *Micrococcus* y *Staphylococcus*, son utilizados en los cultivos iniciadores comerciales. *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 . En ocasiones, la diferenciación de micrococos y estafilococos es difícil ya que una única enzima puede decidir el resultado de una identificación (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 formado, 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 (Campanini *et al.*, 1987; Nieto *et al.*, 1989; Nielsen y Kemner, 1989 y Carrascosa y Cornejo, 1991).

I. 3. 4. 3. Efectos inhibidores de los cultivos lácticos

La maduración de un embutido crudo curado requiere la acción de una amplia variedad de microorganismos presentes en la masa cárnica. La coincidencia de todos ellos en tiempo y espacio origina interacciones que pueden ser de efecto positivo (sinergismo) o negativo (antagonismo). Estas últimas pueden llegar a suprimir el desarrollo de una especie y potenciar el de otra. A mediados de la década de los 60 se inició el estudio de las interacciones entre microorganismos, acaparando especial atención aquellas que se producían entre los grupos bacterianos que eran utilizados como iniciadores. Estas investigaciones despertaron un gran interés por las posibilidades que ofrecía a la industria alimentaria y especialmente en el sector de los productos cárnicos fermentados (Daly *et al.*, 1971; Rantala y Nurmi, 1973).

El antagonismo bacteriano ha sido aprovechado por los tecnólogos de alimentos para suprimir el crecimiento de microorganismos indeseables en las fermentaciones industriales. El uso de cultivos iniciadores proporciona el suficiente número de bacterias para asegurar el predominio sobre la flora natural, incluyendo a los patógenos, y en combinación con el apropiado control del proceso garantiza la seguridad y calidad del producto final.

Como se ha mencionado anteriormente los microorganismos que constituyen fundamentalmente los cultivos iniciadores utilizados en la elaboración de embutidos crudos curados pertenecen a los grupos microbianos de las bacterias lácticas y de las micrococáceas. Es de sobra conocida la capacidad de las bacterias lácticas para inhibir el crecimiento de otros microorganismos, que probablemente sea debido a la acción simultánea de varios factores (Baxter *et al.*, 1983; Anderson, 1986; Gaya *et al.*, 1988).

Las propiedades inhibidoras de los ácidos se han estudiado profundamente y se sabe que actúan a dos niveles, por un lado a pH bajo ejercen una acción tóxica y por otro, originan un medio ácido que es esencial para que las bacterias lácticas se desarrollen en condiciones óptimas aportando otros elementos inhibidores. La mayoría de las bacterias patógenas son sensibles a valores de pH inferiores a 5,4, existen numerosas investigaciones que confirman la sensibilidad de algunas especies patógenas, como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*, a los ácidos producidos por las bacterias lácticas (Barber y Deibel, 1972; Daly *et al.*, 1973; Niskanen y Nurmi, 1976; Metaxopoulos *et al.*, 1981; Genigeorgis, 1989).

Las bacterias ácido lácticas no poseen la enzima catalasa de forma que el peróxido producido durante su crecimiento se acumula en el embutido y puede ejercer una acción de inhibición que en ocasiones afecta también a las propias bacterias lácticas. Esta acción bactericida se atribuye a su alto poder oxidante que actúa oxidando a los lípidos de la membrana y destruyendo la estructura básica molecular de las proteínas celulares (Dahl *et al.*, 1989). No obstante la formación de este metabolito depende de las condiciones ambientales y de la especie o cepa de bacterias lácticas. Aunque inicialmente se apuntó que la presencia de peróxido de hidrógeno inhibía a *Staphylococcus aureus* (Dahiya y Speck, 1968) y a distintas especies del género *Pseudomonas* (Gilliland y Speck, 1977), otros investigadores no han podido confirmar este hecho, aunque admiten una ligera acción antagónica en los primeros días de maduración (Daly *et al.*, 1973; Raccach y Baker, 1978).

Algunas bacterias lácticas sintetizan unos compuestos de naturaleza proteica con capacidad para inhibir el desarrollo de otros microorganismos, estos compuestos se han agrupado bajo la denominación de bacteriocinas y se definen como un grupo heterogéneo de proteínas que varían en su espectro antimicrobiano, propiedades bioquímicas, mecanismo de acción y características

genéticas (Klaenhammer, 1993). Hasta la fecha la bacteriocina mejor conocida es la nisina, que es un polipéptido producido por ciertas cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* que posee un potente efecto inhibitor frente a bacterias Gram positivas, incluyendo *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (Daeschel, 1989), además inhibe la germinación de muchas especies de *Bacillus* y *Clostridium*. Aunque, generalmente, no afecta a las bacterias Gram negativas, éstas se pueden sensibilizar cuando su pared celular se debilita mediante tratamientos subletales (Stevens *et al.*, 1991, 1992).

En 1969 la nisina fue aceptada por la FAO como conservante alimentario y en 1992 la FDA le otorgó el estatus de GRAS (Generally Recognized As Safety) para su empleo en la elaboración de quesos fundidos pasterizados. No obstante, se ha observado que no presenta excesiva utilidad en la industria cárnica, debido a su escasa solubilidad al pH de la carne, su interacción con los fosfolípidos y a la dificultad para su producción “in situ”, dado que *Lactococcus lactis* no se multiplica ni produce nisina en los sustratos cárnicos (Delves-Broughton, 1990).

Los resultados positivos obtenidos con la nisina en productos lácteos han llevado a los investigadores a continuar la búsqueda de nuevas sustancias que puedan tener efecto inhibitor sobre otros microorganismos. Varios autores (Nielsen *et al.*, 1990; Berry *et al.*, 1990; Schillinger *et al.*, 1991; Foegeding *et al.*, 1992; Campanini *et al.*, 1993; Degnan y Luchansky, 1992) han conducido sus estudios a ensayar el potencial de cepas productoras de bacteriocinas en sistemas cárnicos, que han dado como fruto el descubrimiento de nuevas bacteriocinas producidas por cepas lácticas, las más relevantes se recogen en la Tabla 6. Como se puede observar, a diferencia de la nisina, la mayoría de estas bacteriocinas sólo son activas frente a especies bacterianas relacionadas taxonómicamente. Además hasta el momento la nisina es la única bacteriocina cuyo empleo está permitido legalmente como conservante alimentario.

Tabla 6.- Principales bacteriocinas producidas por cepas lácticas (Requena y Peláez, 1995).

Bacteriocina	Microorganismo productor	Espectro inhibición	Referencias
Nisina	<i>Lc. lactis ssp.lactis</i>	Bacterias Gram positivas	Jarvis y Mohoney (1969) Hurst (1981) Spelhaug y Harlander (1989) Liu y Hansen (1990) Horn <i>et al.</i> (1991)
Diplocina	<i>Lc. lactis spp. cremoris</i>	<i>Lactococcus spp.</i>	Davey (1984)
Lactoestrepocinas	<i>Lc. lactis spp. lactis y cremoris</i>	<i>Lactococcus spp.</i> <i>Streptococcus spp.</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Leuconostoc spp.</i>	Davey y Richardson (1981) Kozack <i>et al.</i> (1978)
Lactacina B	<i>Lb. acidophilus</i> N2	<i>Lactobacillus spp.</i>	Barefoot y Klaenhammer (1983 y 1984)
Acidocina 8912	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>	Kanatani <i>et al.</i> (1992)
Helveticina J	<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. bulgaricus</i>	Joerger y Klaenhammer (1986 y 1990)
Lactacina F	<i>Lb. johnsonii</i>	<i>Lactobacillus spp.</i> <i>E. faecalis</i>	Muriana y Klaenhammer (1987 y 1991)
Brevicina 37	<i>Lb. brevis</i>	<i>Pediococcus spp.</i> <i>Leuconostoc spp.</i> <i>Lactobacillus spp.</i>	Rammelsberg y Radler (1990)
Caseicina 80	<i>Lb. casei</i>	<i>L. casei</i>	Rammelsberg <i>et al.</i> (1990)
Curvacina A	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lactobacillus spp.</i> <i>Listeria spp.</i> <i>E. faecalis</i>	Tichaczek <i>et al.</i> (1992)
Plantaricina A	<i>Lb. plantarum</i>	Bacterias lácticas	Daeschel <i>et al.</i> (1990)
Plantaricina S	<i>Lb. plantarum</i>	Bacterias lácticas <i>Propionibacterium</i> <i>Cl. tyobutyricum</i>	Jiménez-Díaz <i>et al.</i> (1990)
Sakacina A	<i>Lb. sake</i>	<i>Lactobacillus spp.</i> <i>Leuconostoc spp.</i> <i>Enterococcus spp.</i> <i>L. monocytogenes</i>	Schillinger y Lücke (1989a) Holck <i>et al.</i> (1992)
Lactocina S	<i>Lb. sake</i>	<i>Lactobacillus spp.</i> <i>Leuconostoc spp.</i> <i>Pediococcus spp.</i>	Mortvedt <i>et al.</i> (1991)
Mesenterocina	<i>Leu. mesenteroides spp. mesenteroides</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Hécharde <i>et al.</i> (1992)
Pediocina PA-1	<i>P. acidilactici</i>	Bacterias lácticas <i>Propionibacterium</i> <i>Brochotrix spp.</i> <i>S. aureus</i> <i>Cl. perfringens</i> <i>Cl. botulinum</i> <i>L. monocytogenes</i>	González y Kunka (1987) Bhunia <i>et al.</i> (1988) Henderson <i>et al.</i> (1992) Nieto-Lozano <i>et al.</i> (1992)

I. 3. 4. 4. Situación actual y nuevos avances

En la actualidad son numerosas las líneas de investigación en relación con la utilización de cultivos iniciadores en la industria alimentaria. Las reacciones que conducen a la formación del aroma y sabor en el producto final y la contribución de las enzimas endógenas y microbianas han centrado parte de estas investigaciones. Distintos autores han ensayado la adición de proteasas y lipasas con el fin de favorecer el desarrollo del aroma y acelerar los procesos de maduración en embutidos crudos curados (Díaz *et al.*, 1993a; 1997; Hagen *et al.*, 1996). Aunque esta aplicación tecnológica de enzimas es independiente de la utilización de cultivos iniciadores, los resultados obtenidos han permitido desarrollar el diseño de cultivos específicos para cada caso, cuyos microorganismos podrían producir las enzimas deseables durante el proceso de fermentación.

La aplicación de la ingeniería genética en la elaboración de cultivos iniciadores es un campo que está aún por explotar. Si hace unos años la elección del cultivo apropiado, para la elaboración de embutidos crudos curados, requería la mezcla de distintas cepas que reunieran los requisitos deseados (que sean catalasa positivos, que contengan las enzimas proteolíticas y lipolíticas, que produzcan bacteriocinas, etc.), hoy en día con estas nuevas técnicas de manipulación genética, en una sólo cepa se pueden introducir todos los genes que codifican los atributos deseables.

Hammes y Hertel (1996) han apuntado los aspectos tecnológicos que sería posible mejorar empleando la ingeniería genética en la elaboración de embutidos crudos curados, los más destacables se recogen en la Tabla 7.

Tabla 7.- Objetivos tecnológicos para la modificación genética de bacterias lácticas de la carne (Hammes y Hertel, 1996).

Objetivos	Manipulación genética
Mejorar la higiene alimentaria	Introducir genes que codifiquen la formación de bacteriocinas o actividad lítica
Mejorar la estabilidad y crecimiento de los organismos iniciadores	Introducir genes que codifiquen la resistencia a fagos
Incrementar las ventajas tecnológicas de los cultivos	Introducir los genes que codifican la presencia de catalasa, la producción de bacteriocinas o la reducción de nitratos y nitritos
Mejorar el aroma	Introduciendo o cambiando los genes que codifican las lipasas y proteasas

La comentada capacidad de las bacterias lácticas para producir bacteriocinas ha atraído la atención de numerosos investigadores, ya que podrían utilizarse para mejorar la competitividad de la cepa iniciadora, prevenir alteraciones microbianas de los alimentos e inhibir el crecimiento de patógenos (Abee, 1995, Montville *et al.*, 1995; Stiles, 1996). Se han realizado ensayos para determinar la inhibición de patógenos por las bacteriocinas y los resultados obtenidos hasta ahora demuestran que las bacterias Gram negativas son resistentes a la mayoría de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas, aunque si son sensibles otras especies patógenas como *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus* (Requena y Pelaez, 1995). En este sentido es importante hacer referencia a otros trabajos que advierten que la inhibición de *Listeria monocytogenes* por bacteriocinas producidas por bacterias lácticas no es reproducible cuando se realiza sobre distintos tipos de embutidos (Hugas *et al.*, 1995; 1998).

Finalmente, otra de las líneas de investigación abierta actualmente es la de utilizar los cultivos iniciadores de bacterias lácticas como cultivos probióticos en embutidos crudos curados. Una cepa probiótica debe ser resistente a los ácidos, a las lisozimas y a la bilis; además debe ser un microorganismo GRAS y preferentemente de origen humano (Hugas y Monfort, 1997).

También hay unas condiciones complementarias que debería cumplir un cultivo probiótico: a) una vez administrado debe ser capaz de activarse y crecer rápidamente y permanecer en el intestino durante un tiempo aceptable (Bruno y Montville, 1993; Havenaar y Huis in't Veld, 1992); b) debe ser resistente a los antibióticos presentes normalmente en los alimentos, pero sensible a los utilizados en la terapia contra infecciones producidas por bacterias lácticas (normalmente penicilinas o aminoglucósidos); c) ni las células, ni los productos de fermentación ni los compuestos celulares después de la muerte bacteriana, deben originar reacciones patogénicas, tóxicas, alérgicas, mutagénicas o carcinogénicas.

Los microorganismos utilizados como cultivos probióticos pertenecen generalmente a especies lácticas aisladas del tracto intestinal humano, tales como *Bifidobacterium* sp. y *Lactobacillus acidophilus*. Los ensayos realizados sobre leche han proporcionado resultados muy satisfactorios, sin embargo, no se pueden extrapolar a otros alimentos como los embutidos crudos curados, ya que el comportamiento bacteriano es totalmente dependiente de los factores ambientales y no se ha podido demostrar la acción bactericida en las condiciones que prevalecen en los embutidos (Hammes y Hertel, 1998).

I. 3. 5. Bioconservadores.

En los últimos años se ha observado una tendencia al consumo de alimentos naturales, libres de conservantes químicos. Los consumidores exigen alimentos de gran calidad, poco procesados, más naturales (sin aditivos

artificiales) y más seguros. Esto ha obligado a los fabricantes a la búsqueda de alternativas a los métodos tradicionales de conservación de alimentos. Como resultado de estas investigaciones ha aparecido en el mercado una amplia variedad de productos de origen biológico que se han denominado bioconservadores.

La bioconservación, según Stiles (1996), se refiere a una extensión de la vida útil y a un incremento de la seguridad de los alimentos utilizando la microflora natural y/o sus productos antibacterianos. Dentro de este término se recogen diversos tipos de productos que tienen en común su origen microbiano, fundamentalmente, de bacterias ácido lácticas. Hasta el momento no se ha realizado una clasificación específica para este tipo de productos y existe un gran vacío legal en este aspecto. En la Normativa Española estos productos se incluirían como reguladores de la maduración en el Anexo II de la Lista Positiva de Aditivos para uso en la elaboración de productos cárnicos embutidos crudos curados (Presidencia del Gobierno, 1986). No obstante, pueden diferenciarse dos grupos principales según su mecanismo de acción: los cultivos protectores con células viables y los productos derivados del metabolismo microbiano con acción inhibidora sobre otros grupos bacterianos, donde se incluirían también las bacteriocinas.

Schillinger y Lücke (1991) definieron los cultivos protectores como organismos cuya principal función es la supresión de microorganismos indeseables y que, contrariamente a los cultivos iniciadores, modifican escasamente las propiedades sensoriales del producto. El empleo de estos cultivos estaría indicado para productos frescos o con un corto período de maduración. Además estudiaron los efectos de la adición de un cultivo de *Lactobacillus sake* sobre distintos productos cárnicos y demostraron que cuando se inoculaba a salchichas frescas se inhibía el desarrollo de *Salmonella*, también en carne picada de vacuno inoculada con *Listeria monocytogenes* se observó una

inhibición del crecimiento de estas. Otra cepa láctica que se ha apuntado para ser utilizada como cultivo protector es *Pediococcus acidilactici*; en los ensayos realizados se evidenció que cuando se inoculaba este microorganismo a salchichas vienasas (muy susceptibles a la contaminación por *Listeria monocytogenes* antes del envasado) se eliminaba la presencia de bacterias patógenas Gram positivas durante el período de almacenamiento en refrigeración (Yousef *et al.*, 1991).

En cuanto al efecto de los cultivos protectores sobre embutidos crudos curados, se ha comprobado que la inoculación de una cepa de *Lactobacillus plantarum* productora de bacteriocinas inhibe el desarrollo de *Staphylococcus aureus* frente a embutidos sin la adición del cultivo, este hecho puede deberse principalmente al descenso del pH, que en el caso de los embutidos inoculados con *Lactobacillus plantarum* se produce más rápido (Schillinger y Lücke, 1991). Posteriormente, Hugas *et al.* (1995) afirmaron que la cepa de *Lactobacillus sake* CTC-494 constituye un buen cultivo protector para embutidos crudos curados y demuestran la acción inhibidora de ésta sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua*. También Kotzekidou y Bloukas (1996) han estudiado el efecto de un cultivo protector, compuesto por *Lactobacillus alimentarius* y *Staphylococcus xylosum*, sobre la vida comercial de jamón en lonchas envasado al vacío y han observado que las muestras inoculadas se mantienen en condiciones aceptables para la venta siete días más que las muestras no inoculadas. En esta línea, Moore y Madden (1997) evaluaron la utilización de un cultivo mixto de *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus cerevisiae* como método natural para conservar paté de hígado de cerdo y determinaron un incremento en la vida útil de hasta 22 días de media.

Otro grupo dentro de los bioconservadores incluiría aquellos productos elaborados a partir de compuestos antimicrobianos procedentes del metabolismo bacteriano, que pueden ser o no purificados y que no contienen células viables de

los microorganismos productores. Actualmente pueden encontrarse en el mercado una gran variedad de este tipo de productos, aunque en algunos casos su supuesta actividad antimicrobiana no está del todo clara. La firma Quest International comercializa un producto denominado “ALTA” resultado de la fermentación de suero lácteo, extracto de levadura y proteínas vegetales por bacterias lácticas; consiste en una mezcla de ácidos orgánicos, proteínas y otros metabolitos, que presentan un amplio espectro antimicrobiano contra levaduras, mohos y bacterias Gram positivas y negativas, aunque no ha sido publicada ni su composición cualitativa y cuantitativa ni su exacto espectro de inhibición (Monfort, 1994). El “BAC STAT RED LABEL” consiste en una mezcla de productos de la fermentación de la dextrosa y lecitina, por bacterias de grado alimentario, que es posteriormente pasteurizado; lo que implica que los principios activos son termoestables. Está comercializado por Rhône-Poulenc y parece ser efectivo, en alimentos con un pH inferior a 5,3, contra bacterias Gram negativas psicrotrofas, mohos y levaduras, pero no contra bacterias Gram positivas. “MICROGARD” es otro bioconservador, comercializado por la firma Wesman Foods, que se obtiene de la fermentación de leche desnatada por *Propionibacterium shermanii* y que posteriormente es pasteurizado (Weber y Broich, 1986). Los estudios realizados han demostrado que este producto puede inhibir el crecimiento de las bacterias psicrotrofas contaminantes y que prolonga la vida comercial de determinados tipos de queso como el cottage (Weber y Broich, 1986; Salih, 1985). El espectro de inhibición abarca a gran parte de bacterias Gram negativas y algunas levaduras y mohos, aunque no tiene acción sobre las bacterias Gram positivas. Microgard contiene ácido propiónico, diacetilo, ácido acético y ácido láctico. Además se ha detectado la presencia de una sustancia de naturaleza proteínica, con cierta actividad inhibidora frente a determinados grupos microbianos, que probablemente sea una bacteriocina y que junto a los ácidos orgánicos contribuye al efecto conservante (Al-Zoreky, 1988).

Finalmente dentro de este grupo de bioconservadores se incluirían las bacteriocinas que pueden añadirse a los alimentos purificadas o bien a través de un cultivo con una cepa productora. Hasta el momento, la bacteriocina más utilizada en forma purificada es la nisina, cuyo empleo está ampliamente difundido en la industria láctea, sin embargo no se han obtenido resultados satisfactorios cuando se emplea en la industria cárnica (Rodríguez, 1996). No obstante, Nielsen *et al.* (1990) han conseguido resultados alentadores al inocular una bacteriocina purificada producida por *Pediococcus acidilactici* a canales refrigeradas. Las últimas investigaciones se dirigen hacia la búsqueda de nuevas bacteriocinas que puedan utilizarse en el sector cárnico, en este sentido Hugas *et al.* (1998), con ensayos en embutidos fermentados, han demostrado la actividad inhibidora frente a *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua* de la sakacina K, una bacteriocina producida por *Lactobacillus sake*. Por otro lado se ha comprobado la acción sinergista y antagonista de algunas bacteriocinas y se ha propuesto la posibilidad de mezclarlas para constituir una combinación de bioconservadores que sería utilizada para conservar alimentos (Muletpowell, 1998).

La aplicación de bioconservadores en la industria alimentaria es una técnica que aunque presenta buenas expectativas aún está emergiendo, Holzapfel (1995) afirma que aunque la bioconservación no puede sustituir a las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF), ofrece un parámetro adicional en el procesado para asegurar la higiene y calidad de los productos.

I. 4. PROCESO DE MADURACION DE LOS EMBUTIDOS CRUDOS CURADOS

I. 4. 1. Modificaciones Bioquímicas

I. 4. 1. 1. Cambios en los hidratos de carbono

Los carbohidratos constituyen una fracción relativamente pequeña en la composición de la carne pero influyen en gran medida en las propiedades de la misma, afectando al color, textura, firmeza, capacidad de retención de agua y vida útil.

El carbohidrato más abundante del músculo es el glucógeno, que en estado de reposo supone el 0,5-1 % del peso total y constituye un “depósito de energía”. El contenido de azúcares es inferior, en torno al 0,10-0,15 %, correspondiendo el 0,10 % a la glucosa-6-fosfato junto con otros azúcares fosforilados. El contenido de glucosa libre asciende a 10-30mg/100g. El ácido láctico se halla en el músculo como producto de la metabolización del glucógeno, en cantidades que dependen del estado funcional del mismo (0,01-0,02 %, en el músculo en reposo; alrededor de un 0,4 % en el músculo fatigado; y hasta un 1 % tras la aparición de la rigidez cadavérica).

El contenido de azúcares de la carne es insuficiente cuando se va a utilizar como materia prima para la elaboración de embutidos crudos curados, ya que estos son el sustrato básico en el proceso de acidificación-fermentación, por lo que es necesario añadir azúcares en la formulación de este tipo de embutidos. La Norma de Calidad española para productos cárnicos embutidos crudos curados estima una cantidad máxima de hidratos de carbono en el producto final de 9 % para la categoría de salchichón extra, 11 % para salchichones de primera, 12,5 % para los de segunda y 14 % para los de tercera, expresados sobre extracto seco (Presidencia del Gobierno, 1980).

Como se ha mencionado anteriormente, la acidificación se produce por la formación de ácido láctico a partir de los azúcares presentes en la masa cárnica. Esto provoca un descenso del pH que es más acusado en los primeros quince días de maduración, tras los cuales sufre pocos cambios (DeKetelaere *et al.*, 1974). Según el modelo matemático descrito por Bello y Sánchez-Fuertes (1997), 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.

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). Los datos anteriores se refieren a experiencias *in vitro*, y hay que tener en cuenta que el comportamiento de los microorganismos se ve afectado por las condiciones del medio; en experiencias realizadas sobre masa de embutido (Liepe *et al.*, 1990) se comprobó que la glucosa no es el azúcar que primero se metaboliza y que en el caso de *Lactobacillus pentosus*, procesa la glucosa, la sacarosa y la maltodextrina casi con la misma velocidad. Por otro lado, la metabolización de la lactosa es muy lenta pero se recomienda su utilización cuando se pretenda conseguir una acidificación menos intensa (Garriga *et al.*, 1988).

El catabolismo de los azúcares de la masa puede realizarse por una 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.

En la fermentación homoláctica, también denominada vía de la glucólisis o vía de Embden-Meyerhof; las bacterias lácticas descomponen la glucosa en dos

moléculas de ácido pirúvico, el cual es posteriormente convertido en lactato por la enzima lactato deshidrogenasa. En esta reacción por cada Gramo de azúcar se forma 1 Gramo de ácido láctico (Andersen y Ten Cate, 1965). Otra posibilidad es la vía de las pentosas fosfato o fermentación heteroláctica en la cual se obtienen como productos finales ácido láctico, ácido acético y etanol. También pueden producirse pequeñas cantidades de ácido propiónico y butírico dependiendo del azúcar metabolizado.

Los procesos fermentativos concluyen aproximadamente tres semanas después de la elaboración y en su lugar se inician cambios oxidativos de los azúcares residuales y de los ácidos formados, como resultado de estas reacciones se produce CO_2 y H_2O (DeKetelaere *et al.*, 1974). Determinadas especies de lactobacilos como *Lactobacillus sake* y *Lactobacillus curvatus* en medio aeróbico oxidan la glucosa produciendo H_2O_2 y piruvato (Kandler, 1983). La acumulación de estos productos de degradación y de ácidos orgánicos, que no sean el láctico, en la masa del embutido puede originar defectos de color, sabor y aroma en el producto final.

I. 4. 1. 2. Cambios en los compuestos nitrogenados

Las proteínas son, junto a las grasas, los componentes mayoritarios de la materia seca de los productos cárnicos y constituyen el sustrato de una serie de reacciones bioquímicas que dan lugar a grandes modificaciones de la calidad sensorial de los embutidos, fundamentalmente relacionadas con la textura, el aroma y el sabor.

El porcentaje de proteínas de los embutidos crudos curados varía dependiendo del tipo de producto elaborado. La Norma de Calidad para productos cárnicos embutidos crudos curados establece una clasificación de estos productos basada en el porcentaje mínimo de proteínas cárnicas que contienen. En esta clasificación se definen cuatro categorías para el salchichón: extra,

primera, segunda y tercera, con un porcentaje mínimo de proteínas sobre el extracto seco de 30 %, 26 %, 24 % y 18 %, respectivamente (Presidencia del Gobierno, 1980).

Básicamente toda la proteína presente en el embutido procede de la carne. Recordemos que el tejido muscular contiene como promedio un 19 % de proteínas, que se pueden englobar en tres tipos: miofibrilares, sarcoplásmicas y del tejido conectivo. Las proteínas miofibrilares (solubles en soluciones salinas de alta fuerza iónica) son la fracción mayoritaria y constituyen aproximadamente el 55 % de la proteína total del tejido muscular. Esta fracción engloba distintos tipos de proteínas pero las más abundantes son la miosina y la actina que conforman, respectivamente, el filamento grueso y delgado del sarcómero. Las proteínas sarcoplásmicas (solubles en agua y en soluciones salinas diluidas) constituyen el 25-30 % de la proteína total del tejido muscular y engloba a enzimas y mioglobina. Finalmente las proteínas del tejido conectivo constituyen una fracción insoluble en soluciones salinas y su representante mayoritario es el colágeno.

Los cambios que se producen en los compuestos nitrogenados de los embutidos durante la maduración están relacionados fundamentalmente con dos fenómenos: la solubilización y la proteólisis de las proteínas. El fenómeno de la solubilización de las proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas se produce en los primeros estadios de la maduración como consecuencia del aumento de la fuerza iónica por la adición de sal y es el principal responsable del desarrollo de la textura y consistencia de los productos crudos curados. El proceso de solubilización y la posterior gelificación de las proteínas, será abordado en el capítulo dedicado a la consistencia (I.4.2.3).

El fenómeno de proteólisis se debe principalmente a la actividad de las enzimas proteolíticas de origen microbiano y muscular. Esta actividad provoca un incremento del nitrógeno no proteico (NNP) compuesto por distintas

fracciones como péptidos, aminoácidos libres, aminas, amoniaco y amonio. La composición y concentración de estos compuestos determinará a largo plazo el aroma y sabor final de los embutidos crudos curados (De Ketelaere *et al.*, 1974).

Como se ha mencionado anteriormente, todos estos cambios sobre los compuestos nitrogenados de los embutidos se deben principalmente a la actividad de enzimas proteolíticos de origen microbiano y muscular. Los primeros estudios que señalaban la participación de los microorganismos en los procesos de degradación de proteínas en embutidos crudos curados aparecieron a principios de los años 70 (Sajber *et al.*, 1971; Klement *et al.*, 1974). Estos autores apuntaron que los microorganismos involucrados en el proceso de maduración podían producir enzimas capaces de actuar sobre las proteínas de la carne. Posteriormente han aparecido varios trabajos que han apoyado esta hipótesis (Lücke y Hechelman, 1986; Toldrá y Etherington, 1988; Vignolo, 1988; Naes *et al.*, 1991). Con respecto a la actividad de estas proteasas microbianas se ha señalado que son especialmente efectivas en la rotura de oligopéptidos y pequeños péptidos originados por la acción previa de los enzimas endógenos de la carne, que actúan en las fases iniciales del proceso de degradación de proteínas (Verplaetse *et al.*, 1994).

Existe gran controversia sobre la participación de las bacterias lácticas en los procesos proteolíticos en embutidos. Algunos autores consideran que desarrollan una importante acción proteolítica elaborando proteinasas y peptidasas ligadas a la membrana y a la pared celular que contribuyen al incremento de aminoácidos libres (Reuter *et al.*, 1975; DeMasi *et al.*, 1990; Naes y Nissen-Meyer, 1992). Se han aislado proteinasas de distintas cepas de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* que al inocularlas en embutidos producen una considerable disminución del tiempo de maduración además de mejorar el aroma y color del producto final (Naes *et al.*, 1995; Hagen *et al.*, 1996). Otros investigadores han aislado y purificado peptidasas de *Lactobacillus*

sake (Montel *et al.*, 1992, 1995) y aminopeptidasas de *Lactobacillus plantarum* (Fadda *et al.*, 1998) y han comprobado que producen un aumento en la concentración de aminoácidos libres. Por otro lado, determinadas cepas de *Pediococcus cerevisiae* producen enzimas proteolíticas que intervienen en la degradación de las proteínas en los productos crudos curados (García de Fernando y Fox, 1991; Johansson *et al.*, 1994). Sin embargo, otros autores han señalado que la actividad proteolítica de las bacterias lácticas es débil comparada con la de otros grupos microbianos como *Bacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas* o *Micrococcaceae* (Law y Kolstad, 1983). En la actualidad no se conoce completamente el mecanismo proteolítico de estos microorganismos aunque se cree que debe ser similar al de los lactobacilos aislados de productos lácteos.

En los últimos años se ha observado un interés creciente por la utilización de proteasas exógenas para acelerar los procesos de maduración de los embutidos crudos curados (Naes *et al.*, 1991, Naes y Nissen-Meyer, 1992). En salchichón se ha ensayado la pronasa E obtenida de *Streptomyces griseus* (Díaz *et al.*, 1993a) y la aspartil proteinasa de *Aspergillus oryzae* (Díaz *et al.*, 1992) obteniéndose al final de la maduración mayores concentraciones de NNP en los salchichones adicionados de estas proteasas aunque no se observaron diferencias en la evaluación sensorial.

Otro grupo microbiano involucrado en la maduración de los embutidos y que también participa en los procesos proteolíticos es el de las micrococáceas que incluye a los géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus*. Sajber *et al.*, (1971) señalaron que la presencia de micrococos en el embutido incrementaba la concentración de aminoácidos libres; posteriormente Lücke y Hechelman (1986) confirmaron la actividad proteolítica de estos microorganismos. No obstante existen diferentes opiniones sobre la participación de este grupo en los procesos de proteólisis de los productos curados. Diversas investigaciones realizadas *in vitro* han puesto de manifiesto que *Staphylococcus carnosus* y *Staphylococcus*

xylosus no tienen capacidad proteolítica (Silla *et al.*, 1989), aunque si la posee *Micrococcus varians* (Scheleifer, 1986). Sin embargo, en trabajos posteriores se demostró que cepas de *Staphylococcus xylosus* aisladas de jamón curado presentaban una clara actividad proteolítica *in vitro* (Nieto *et al.*, 1989; Carrascosa y Cornejo, 1991) lo cual coincide con los estudios desarrollados por Miralles *et al.* (1996) con cepas de *Staphylococcus xylosus* aisladas de salchichón. También se han obtenidos resultados positivos en los estudios realizados con cultivos iniciadores mixtos de cepas de lactobacilos y micrococos proteolíticos (*Lactobacillus sake* LAD, *Lactobacillus pentosus* O3A y *Micrococcus varians* 13) obteniéndose mayor grado de proteolisis en aquellos embutidos en los que se utilizaron los cultivos mixtos que en los que se utilizó un cultivo simple (O'Connell *et al.*, 1997); revocándose así los trabajos previos en los que se afirmaba que la evolución de las distintas fracciones nitrogenadas no se veía afectada por la adición de cultivos iniciadores durante la elaboración de los embutidos crudos curados (De Ketelaere *et al.*, 1974; Dierick *et al.*, 1974).

Las enzimas del tejido muscular son también responsables de los procesos proteolíticos que tienen lugar durante la maduración del embutido. La carne posee tres sistemas enzimáticos endógenos: calpaínas, catepsinas y el complejo proteinasa multicatalítico. También se pueden encontrar en la carne exopeptidasas del tipo peptidasas y aminopeptidasas.

Las calpaínas son proteinasas calcio dependientes que se encuentran en el citosol de las miofibrillas. Se han detectado al menos dos formas, calpaína I y calpaína II que son inhibidas por otra proteína, la calpastatina. El pH óptimo de actuación de estas enzimas es superior a 6 por lo que a los valores de pH frecuentes en los embutidos crudos curados (próximos a 5,5) presentan escasa actividad y por tanto su acción no muy es relevante (Sárraga *et al.*, 1993). No obstante, la acción proteolítica de estas enzimas en el músculo post-mortem tiene gran importancia y se ha demostrado que la calpaína I es la responsable del

ablandamiento inicial de la carne y que posteriormente actúa la calpaína II hasta que se destruyen por autólisis (Lawrie, 1998). La actuación de las calpaínas no se produce directamente sobre la actina o miosina sino que se localiza sobre la línea Z, degradando a las proteínas que constituyen los filamentos de unión entre los sarcómeros (Lawrie, 1998 citando a Goll *et al.*, 1970).

La actividad proteolítica de las calpaínas no está muy estudiada en embutidos crudos curados, sin embargo si se han realizado numerosos trabajos para determinar esta actividad en jamones curados (Koochmaraie *et al.*, 1987; Dransfield *et al.*, 1992; Rosell *et al.*, 1996; Toldrá y Flores, 1998). Durante el procesado de los jamones se ha detectado que la acción de las calpaínas es más intensa en las primeras etapas del proceso aunque se conserva, con menor intensidad, hasta el postsalado (Sárraga, 1992). No obstante se ha observado que la actividad de estas enzimas puede quedar inhibida por agentes del curado como los nitritos, el ácido ascórbico y los polifosfatos (Rosell y Toldrá, 1996); por lo que es necesaria una cuidadosa selección de las concentraciones de las sales del curado y de los parámetros del proceso.

Las catepsinas son proteinasas que se encuentran en los lisosomas de las células musculares y cuya actividad se ve favorecida por el pH ácido, por lo que los embutidos constituyen un medio óptimo para la actividad de estas enzimas (Verplaetse *et al.*, 1989). Actualmente se conocen siete tipos de catepsinas, de las cuales tres son exoproteasas (A, C y B₂) y las restantes son endoproteasas (B, D, H y L). Las más importantes en el proceso proteolítico son las catepsinas B, D y L, todas ellas son capaces de degradar a las proteínas miofibrilares por debajo de pH 5,5, aunque la más importante de las tres es la catepsina L. No obstante, recientes investigaciones señalan que inicialmente la proteólisis corre a cargo de la catepsina D y que posteriormente son las enzimas de origen microbiano las principales responsables de la degradación de los fragmentos de proteínas formados (Molly *et al.*, 1997). Las catepsinas actúan degradando las proteínas que conforman el filamento delgado (troponinas T e I, nebulina, actina, actinina

α y proteína C) y el filamento grueso (cadenas ligeras y pesadas de miosina), a diferencia de la acción de las calpaínas que se produce al nivel de la línea Z. Aunque la localización de las catepsinas dentro de los lisosomas celulares pueda suponer un obstáculo para su acción, en el caso de los embutidos crudos curados no lo es, ya que la operación de picado rompe las fibras musculares y favorece la liberación de estas proteasas.

Finalmente se ha descrito un tercer sistema de actividad proteolítica propia de la carne que se ha denominado “complejo proteinasa multicatalítico” formado por una unidad funcional de gran peso molecular, aproximadamente 700 KD, que comprende al menos tres subunidades distintas, con diferente actividad proteolítica frente a las secuencias de aminoácidos hidrofóbicos, básicos y ácidos. También se ha detectado la presencia de dipeptidasas y aminopeptidasas tisulares que pueden participar en la degradación de las proteínas y cuyos pHs óptimos de actuación oscilan entre 4,5-6 y 6-8, respectivamente (Toldrá *et al.*, 1993).

La degradación proteica no se produce de la misma forma sobre las proteínas que constituyen la carne y este es otro tema que ha generado cierta polémica entre los investigadores ¿cual es el sustrato más utilizado en la proteólisis?. Algunos autores afirman que la proteólisis afecta fundamentalmente a las proteínas miofibrilares que son las principales responsables de la textura y firmeza del embutido (Klement *et al.*, 1973; Cid *et al.*, 1992); sin embargo, para otros autores la actividad proteolítica más intensa se produce sobre las proteínas sarcoplásmicas, afectando sólo ligeramente a las proteínas miofibrilares y a las del tejido conectivo (Maggi *et al.*, 1977; Buscailhon *et al.*, 1994a).

La intensidad de la proteólisis se ve influenciada por diversos factores aunque los más destacables son la temperatura y el pH. La proteólisis es una reacción enzimática y por tanto existe una relación directamente proporcional

entre la temperatura y la actividad de los enzimas proteolíticos. En el caso de los productos crudos curados madurados con temperaturas bajas (10-12° C) el grado de proteolisis será menor que en embutidos madurados con temperaturas más altas (20-25° C). En cuanto al pH se establece una relación inversa con la proteolisis, es decir, cuando el pH desciende aumenta la actividad proteolítica. Esto se debe a que el pH ácido incrementa la actividad de los enzimas proteolíticos, además la acidificación favorece la desnaturalización e insolubilización de las proteínas miofibrilares, las cuales en estas condiciones se hacen más susceptibles a la acción proteolítica de origen microbiano (Klement *et al.*, 1974).

Otro factor que influye en la intensidad de la proteolisis, aunque en menor medida, es el grado de picado de la materia prima. Se ha demostrado que los tratamientos más intensos (picado fino) incrementan la proteolisis ya que facilitan la rotura de la fibra muscular (Cid *et al.*, 1992). También intervienen otros factores como tipo de músculo, presencia de hormonas agónista (β -agonista), estado bioquímico del músculo, etc.

La segunda modificación importante que se produce en las proteínas es el fenómeno de solubilización que puede apreciarse en los primeros estadios de la maduración del embutido. Se debe al aumento de la fuerza iónica por la adición de sal y es de vital importancia para la formación del gel que dará consistencia y textura al producto. La solubilización de las proteínas también se ve afectada por el pH. Una concentración de sal muy elevada puede originar desnaturalización proteica y como consecuencia la insolubilización de las proteínas provocando defectos en la consistencia. Por otro lado el descenso de pH durante la fermentación del embutido también origina la pérdida de la solubilidad de las proteínas, aunque afecta en mayor medida a las proteínas sarcoplásmicas que a las miofibrilares (Cid *et al.*, 1992). Cualquier factor que altere la solubilidad de

las proteínas afectará necesariamente a la textura del producto y por tanto repercutirá en la dureza y consistencia al corte.

I. 4. 1. 3. Cambios en los compuestos lipídicos

Los lípidos constituyen el componente mayoritario de los embutidos crudos curados y al igual que las proteínas, también sufren cambios a lo largo del proceso de maduración. La degradación y transformación de los lípidos da lugar a la aparición de un gran número de moléculas que van a ser responsables en parte del desarrollo del aroma y sabor típicos de los embutidos.

La Norma de Calidad para productos cárnicos embutidos crudos curados establece para las distintas categorías de salchichones (extra, primera, segunda y tercera) unos porcentajes máximos de grasa sobre extracto seco, que son 57 %, 62 %, 65 % y 70 %, respectivamente (Presidencia del Gobierno, 1980).

La carne posee grasa infiltrada pero no en cantidad suficiente para alcanzar los porcentajes empleados en la elaboración de embutidos, por tanto es necesario añadir grasa del tejido adiposo subcutáneo o depósitos grasos.

Los lípidos del tejido muscular se sitúan entre los haces de fibras musculares y constituyen la grasa de infiltración o veteado. Estos lípidos presentan diferencias importantes con los del tejido adiposo subcutáneo. La grasa intramuscular está compuesta en su mayor parte por lípidos neutros, entre los que destacan los triglicéridos, que dependiendo del tipo de músculo representan entre un 62-82 % de los lípidos musculares. Contiene además una gran proporción de fosfolípidos, cuyo porcentaje oscila entre el 17-34 % y pequeñas cantidades de colesterol y vitaminas liposolubles que constituyen la fracción insaponificable.

La composición de ácidos grasos de la masa inicial, en especial la proporción de ácidos grasos saturados e insaturados, jugará un papel fundamental en el desarrollo del sabor y aroma de los embutidos. En la Tabla 8 se detalla la

composición de ácidos grasos de los lípidos presentes en los ingredientes principales: carne magra de cerdo y vacuno y tocino de cerdo.

Tabla 8.- Composición porcentual de ácidos grasos de las materias primas empleadas en la elaboración de embutidos crudos curados (según Fernández *et al.*, 1995).

Acido graso	Magro de ternera	Magro de cerdo	Tocino de cerdo
C10:0 Cáprico	-	0,16	0,10
C12:0 Láurico	-	0,16	0,21
C14:0 Mirístico	3,11	1,31	1,36
C16:0 Palmítico	25,96	24,39	24,92
C16:1 Palmitoleico	4,39	3,44	2,83
C18:0 Esteárico	13,53	11,95	14,14
C18:1 Oleico	43,88	45,50	43,14
C18:2 Linoleico	3,66	9,66	10,68
C18:3 Linolénico	0,18	0,65	1,05
C20:4 Araquidónico	0,54	1,31	-
Otros AG Saturados	2,19	0,33	-
Otros AG	2,19	1,15	1,05
Monoinsaturados			
Otros AG Poliinsaturados	0,37	-	-
Total saturados	44,79	38,30	40,73
Total monoinsaturados	50,45	50,08	47,23
Total poliinsaturados	4,75	11,62	11,73

El tocino forma parte de la grasa del tejido adiposo subcutáneo y está constituido en su mayor parte por triglicéridos y contenidos muy bajos de fosfolípidos, además de una pequeña fracción insaponificable. Tanto en el tocino como en el magro de cerdo, aproximadamente el 40 % de los ácidos grasos son saturados (de ellos una tercera parte es ácido esteárico), un 50 % son monoinsaturados (fundamentalmente oleico) y un 10 % son poliinsaturados.

La grasa del tejido muscular de vacuno constituye un 2-4 % de la grasa total corporal y contiene alrededor de un 4 % de fosfolípidos. Los ácidos grasos poliinsaturados de los triglicéridos suponen un 3-4 % del total de ácidos grasos y el representante mayoritario es el ácido linoleico. El contenido global de ácidos grasos saturados es mayor que el de la carne de cerdo aunque la cantidad de insaturados es aproximadamente un 5 % inferior que la de cerdo.

La modificación de los compuestos lipídicos durante la maduración de los embutidos abarca complejos mecanismos que aún no son bien conocidos pero que incluyen una primera fase de lipólisis y otra posterior de oxidación. La degradación hidrolítica de las grasas origina la liberación de ácidos grasos libres y se produce por la acción de las lipasas del tejido adiposo y de las aportadas por los microorganismos involucrados en el proceso de maduración de los embutidos (micrococos y lactobacilos, principalmente). Los cambios oxidativos se producen sobre los ácidos grasos insaturados originando la producción de peróxidos, compuestos carbonilos y moléculas de pequeño peso molecular como alcoholes y ácido carboxílico; también estos cambios se deben, en parte, al metabolismo bacteriano.

Los fenómenos hidrolíticos implican la rotura del enlace éster de los triglicéridos de la grasa por acción de las enzimas lipolíticas o lipasas. Esto origina un descenso continuo del contenido de triglicéridos durante la maduración con la consiguiente acumulación de compuestos de menor peso

molecular como ácidos grasos libres, diglicéridos y en menor medida monoglicéridos o glicerol, cuando la hidrólisis afecta a las tres posiciones de esterificación del triglicérido. Al final del proceso de maduración los ácidos grasos libres representan aproximadamente el 5 % del contenido total de ácidos grasos (Demeyer *et al.*, 1974). La acumulación de diglicéridos y ácidos grasos libres sugiere que la actuación de las lipasas se produce preferentemente sobre las posiciones externas de la molécula del triglicérido. Los triglicéridos de la grasa de cerdo muestran un modelo particular en la distribución de los ácidos grasos, la mayor parte del ácido esteárico (aprox. 60 %) se encuentra en la posición 1, el ácido palmítico (60-80 %) en la posición 2 y los ácidos octadecanoicos (50-60 %) en la posición 3. Si las lipasas atacan específicamente la posición 1 ó 3, el grado más intenso de lipólisis debería conducir a una liberación de los ácidos esteárico y octadecanoicos. Esta especificidad se ha atribuido especialmente a las lipasas de origen microbiano (Alford *et al.*, 1971).

Asimismo, se han atribuido fenómenos de especificidad a las lipasas endógenas del músculo. Se han asociado cuatro tipos de especificidad: de acilglicerol, de posición, de ácidos grasos y estereoespecificidad (Gardener, 1980). La especificidad de acilglicerol se caracteriza por mostrar preferencia por los triglicéridos de bajo peso molecular y la de posición hidroliza únicamente a los esteres primarios de los triglicéridos, hasta el momento no se ha descrito ninguna lipasa que hidrolice sólo el ester secundario. Finalmente, se habla de especificidad de ácidos grasos cuando un determinado ácido es hidrolizado más rápidamente que otro, independientemente de su posición.

En el tejido adiposo se encuentra la lipasa lipoproteína y la lipasa hormona sensible que hidrolizan triglicéridos (Mersmann *et al.*, 1974), y la lipasa monoacilglicerol que ataca fundamentalmente a monoglicéridos (Belfrage *et al.*, 1984). También se ha detectado el sistema esterasa que hidroliza triglicéridos a ácidos grasos libres de cadena corta y glicerol (Khao *et al.*, 1978). No obstante, y

al igual que ocurre con las proteasas endógenas, la actividad de estas enzimas está condicionada por factores como son el origen de la carne utilizada como materia prima y los parámetros del proceso: temperatura, tiempo, actividad de agua, potencial redox y concentración de sal (Toldrá, 1998).

Los fosfolípidos de las membranas también pueden ser hidrolizados por la acción de las fosfolipasas presentes en las mitocondrias y los lisosomas de las células musculares. Las fosfolipasas hidrolizan los grupos acilo esterificados y los situados a ambos lados del grupo fosforilo. Se han identificado cuatro fosfolipasas (A, B, C y D) que se diferencian en la posición sobre la que escinden al fosfolípido. Sin embargo, la liberación de ácidos grasos a partir de fosfolípidos sólo se ha observado en embutidos con periodos de maduración largos y en todo caso la cantidad de ácidos grasos liberados es significativamente inferior que la obtenida por la hidrólisis de los triglicéridos (Cantoni *et al.*, 1966).

Tal y como ocurre en la proteólisis, existen distintas opiniones sobre el grado de participación de las lipasas microbianas y endógenas en los procesos proteolíticos. Demeyer *et al.* (1974) apuntaron que la hidrólisis de las grasas se debía principalmente a la actividad de las lipasas bacterianas aunque también indican la posible participación de las lipasas del músculo y del tejido adiposo. En recientes investigaciones se han estudiado salchichones a los que se adicionaron antibióticos, con el fin de eliminar toda la flora del embutido, y se ha comprobado que a lo largo de la maduración la producción de ácidos grasos libres no fue significativamente mayor en los salchichones sin antibióticos, lo cual sugiere que la lipólisis es casi exclusivamente llevada a cabo por las lipasas del músculo y del tejido graso (Molly *et al.*, 1996; 1997).

No obstante, existen numerosos trabajos que demuestran la actividad lipolítica de los microorganismos involucrados en la maduración y su participación en los procesos de degradación de las grasas en los embutidos crudos curados (Selgas *et al.*, 1986; Sanz *et al.*, 1988; Beriain, 1993). Las

bacterias Gram negativas presentes en la masa cárnica inicial, especialmente el género *Pseudomonas*, pueden iniciar los fenómenos lipolíticos pero rápidamente pasan a prevalecer en la masa otros géneros microbianos, las micrococáceas y las bacterias lácticas, que van a ser los principales microorganismos que intervienen en la lipólisis.

La actividad lipolítica de los micrococos ha sido investigada por numerosos autores. Debevere *et al.* (1976) examinaron cepas de *Micrococcus* sp. y observaron la liberación de ácidos grasos libres sobre un sustrato de grasa de cerdo. De la misma forma fue demostrada la actividad lipolítica de *Staphylococcus xylosum* y *Staphylococcus carnosus* (Campanini *et al.*, 1987; Nielsen y Kemner, 1989). Posteriormente Sorensen y Samuelsen (1996) determinaron las condiciones óptimas de actuación de las lipasas de *Staphylococcus xylosum*, y comprobaron que la actividad de estas enzimas se ve fuertemente inhibida bajo las condiciones de la fermentación del embutido. No obstante, en experiencias realizadas sobre embutidos se observó que salchichones en los que se habían obtenido menores recuentos de micrococáceas el grado de lipólisis era menor que en los que se obtuvieron recuentos mayores (Beriain *et al.*, 1993). Sin embargo, Selgas *et al.* (1986) indican que la actividad lipolítica de los micrococos se debe fundamentalmente a lipasas extracelulares, de forma que aunque el número de células viables decrezca significativamente en los primeros estadios de la maduración, la acción de las lipasas microbianas continúa. Asimismo en embutidos inoculados con *Staphylococcus xylosum* y *Staphylococcus carnosus* se observó al final de la maduración mayores concentraciones de aldehídos y cetonas (Montel *et al.*, 1997). Finalmente y en contraposición a estos trabajos, Hierro *et al.* (1997) no han encontrado diferencias en el contenido de ácidos grasos libres de embutidos inoculados con *Staphylococcus* sp. y *Micrococcus* sp., en comparación a embutidos sin inocular.

En cuanto a la actividad lipolítica de las bacterias lácticas, ésta ha sido investigada por numerosos autores sobre medios sintéticos y grasas naturales (Reuter, 1975; El Soda *et al.*, 1986; Papon y Talon, 1988; Nielsen y Kemner, 1989). Las enzimas lipolíticas son intracelulares, su producción está relacionada con la fase de crecimiento exponencial y está estimulada por las bajas concentraciones de glucosa; además la máxima producción de lipasas se obtiene a las temperaturas óptimas de crecimiento y a pH neutro (Papon y Talon, 1988).

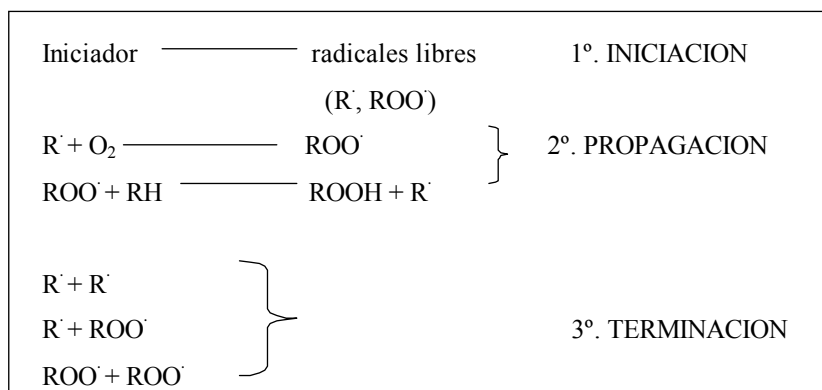
Los estudios realizados por Sanz *et al.* (1988) demostraron que los lactobacilos pueden contribuir a la hidrólisis grasa por su capacidad para atacar triglicéridos de cadena corta y diglicéridos. Según estos autores, la hidrólisis microbiana se completaría en dos etapas, la primera, en la que actuarían las lipasas liberadas por las micrococáceas sobre los triglicéridos y que originarían ácidos grasos de menor peso molecular que serían hidrolizados en una etapa posterior por los lactobacilos.

Naes *et al.* (1991) estudiaron el efecto de una proteinasa purificada de una cepa de *Lactobacillus sake* aislada de un embutido crudo curado y confirmaron su influencia sobre la degradación de grasas con un aumento de los compuestos responsables del aroma. También, Andersen *et al.* (1995) estudiaron las propiedades de una lipasa de *Lactobacillus plantarum* y comprobaron su contribución a las cualidades sensoriales del embutido. No obstante, en recientes investigaciones se ha ensayado la actividad lipolítica de cepas de lactobacilos, pediococos, micrococos y estafilococos y se ha observado que las cepas lácticas analizadas no presentan actividad lipolítica, en cambio sí se ha observado una elevada actividad en las cepas de estafilococos y micrococos, aunque ésta se reduce considerablemente cuando actúan bajo las condiciones predominantes en el embutido crudo curado (Kenneally *et al.*, 1998a).

Como se ha citado anteriormente, las lipasas microbianas que actúan en los embutidos se caracterizan por su preferencia a atacar las posiciones externas en la molécula del triglicérido, ésto se demuestra por la acumulación de diglicéridos y ácidos grasos libres principalmente. Según Demeyer *et al.* (1974) esta especificidad se demuestra en los embutidos crudos curados por la liberación de los ácidos grasos en la siguiente relación decreciente: linoleico > oleico > esteárico > palmítico. No obstante esta especificidad por la posición 3 del triglicérido no fue evidenciada por otros investigadores en embutidos crudos curados (Domínguez y Zumalacárregui, 1991).

La oxidación de los lípidos es una de las principales causas de deterioro de los alimentos, ya que da lugar a la aparición de sabores y olores desagradables. Sin embargo, en determinadas condiciones es deseable un cierto grado de oxidación lipídica para conseguir el desarrollo de aromas y sabores típicos, como es el caso de los embutidos crudos curados. La oxidación es por tanto el segundo fenómeno importante en la degradación de las grasas de estos productos. Tras la hidrólisis se han liberado ácidos grasos libres, principalmente insaturados, que son el sustrato para las reacciones de oxidación y que resultarán en la producción de peróxidos lipídicos (hidroperóxidos), epóxidos, furanos, alcoholes, hidrocarburos y compuestos carbonilos (aldehídos y cetonas).

La autooxidación consiste en la reacción con oxígeno molecular y es la principal implicada en el deterioro producido por la oxidación de los lípidos, que se pueden producir por reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Esta reacción tiene lugar mediante mecanismos típicos de radicales libres y se resume en tres etapas básicas:



La etapa de iniciación tiene lugar por descomposición de un hidroperóxido mediante un catalizador metálico, o por exposición a la luz, así se formarán los primeros radicales libres para iniciar la propagación. Una vez formado un número suficiente de radicales, se propaga la reacción en cadena al captar átomos de hidrógeno en las posiciones alfa de los dobles enlaces (R·). En estas posiciones se produce después la adición del oxígeno, dando lugar a la producción de radicales peróxido ROO·, que a su vez captan hidrógeno de los grupos alfa-metilénicos RH de otras moléculas para dar hidroperóxidos ROOH y grupos R·; estos a su vez reaccionan con el oxígeno repitiéndose nuevamente la secuencia de reacción descrita.

Los hidroperóxidos, productos primarios de la autooxidación lipídica, son relativamente inestables e intervienen en numerosas y complejas reacciones de ruptura e interacción, que son las responsables de la producción de una gran variedad de compuestos de distintos pesos moleculares, volátiles y no volátiles. La ruptura de los hidroperóxidos se produce en dos etapas: en la primera se rompe el enlace oxígeno-oxígeno del grupo hidroperóxido, dando lugar a un radical alcoxilo y a un radical hidroxilo; en la segunda etapa se rompe el enlace carbono-carbono a uno u otro lado del grupo alcoxilo. En general, la ruptura por el lado ácido (el lado carboxilo o éster) da lugar a la formación de un aldehído y un ácido (o éster) y por el lado hidrocarbonado (o metil) a un hidrocarburo y un

oxoácido (u oxoester). Los aldehídos son los compuestos típicos mayoritarios obtenidos de la oxidación de las grasas y se descomponen siguiendo dos vías. Los aldehídos saturados se oxidan fácilmente dando lugar a los ácidos correspondientes y pueden participar en reacciones de condensación y dimerización. Por otro lado, los aldehídos insaturados pueden experimentar a su vez la autooxidación clásica mediante el ataque del oxígeno en las posiciones alfa-metilénicas dando lugar a hidrocarburos de cadena corta, aldehídos y dialdehídos, como el malonaldehído. La formación del malonaldehído es el fundamento del método para medir la oxidación final de las grasas, utilizando ácido tiobarbitúrico (TBA). Los radicales alquilo y alcoxi formados pueden sufrir otras reacciones de degradación y dar lugar a productos como: aldehídos, alcoholes o hidroperóxidos.

En carne y productos cárnicos el método más comúnmente usado para determinar la oxidación lipídica primaria es la determinación del índice de peróxidos, puesto que son los productos iniciales mayoritarios de la autooxidación. Sin embargo, algunos autores no recomiendan este método en productos cárnicos, ya que la inestabilidad de los hidroperóxidos intermediarios puede llevar a error por defecto (Smith *et al.*, 1990; Davis *et al.*, 1993). Para determinar la oxidación lipídica secundaria se utiliza el método del ácido tiobarbitúrico (TBA) (Tarladgis *et al.*, 1960) aunque también presenta algunos inconvenientes, ya que otros componentes del producto distintos del malonaldehído pueden reaccionar con el TBA (Raharjo *et al.*, 1993). Para el estudio de otros compuestos generados durante la oxidación se han utilizado diversas técnicas cromatográficas como la cromatografía líquida, de capa fina, de exclusión y gaseosa que se basan en la separación y determinación cuantitativa de algunas fracciones, como las volátiles, polares o de componentes individuales como el pentano o el hexanal, productos típicos producidos a lo largo de la oxidación.

En embutidos crudos curados, durante los primeros días de la maduración, se produce un incremento del contenido de peróxidos que se generan a partir de los ácidos grasos liberados durante la lipólisis. Los compuestos carbonilos también sufren un incremento en los primeros estadios de la maduración, aunque luego decrecen en la siguiente semana de maduración, para aumentar nuevamente al final del proceso. Durante la fase de estufaje del embutido se está desarrollando plenamente el metabolismo fermentativo de los microorganismos y se están generando gran cantidad de grupos carbonilos procedentes de la fermentación bacteriana de los carbohidratos. El aumento al final del proceso de maduración se debe al metabolismo, también microbiano, de los peróxidos lipídicos (Cerise, 1973).

Como se ha mencionado con anterioridad la oxidación de los lípidos se lleva a cabo por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Tradicionalmente la oxidación lipídica se ha atribuido a los grupos hemo de la hemoglobina y mioglobina como catalizadores de la reacción. Sin embargo, otros autores sugieren que estos grupos no tienen efecto catalítico sino que son los iones hierro no hemínico (hierro libre) los responsables de la oxidación, ya que actúan catalizando la descomposición de los hidroperóxidos en radicales libres que serán los iniciadores de la reacción de propagación. (Igene y Pearson, 1979; Gatellier *et al.*, 1992). El ión ferroso descompone los hidroperóxidos en radicales alcoxi ($\text{RO}\cdot$) mientras que el ión férrico produce radicales peroxi ($\text{ROO}\cdot$). Además del hierro libre también participan otros componentes de la fracción “no hemo” del tejido muscular como la transferrina, la ferritina y algunos compuestos de la cadena respiratoria mitocondrial. En cuanto a la intervención de enzimas en los procesos de oxidación, existen sistemas enzimáticos en las células que constituyen el músculo esquelético. Estas enzimas necesitan la intervención de cofactores (NAD y NADPH) y la presencia de ADP y hierro (Fe^{+2} o Fe^{+3}) para su máxima actividad. Al igual que ocurre con otros fenómenos donde intervienen

enzimas, las condiciones reinantes en los embutidos curados inhiben sensiblemente la actividad de estas enzimas por lo que se considera que la oxidación en estos productos se debe en gran parte al metabolismo bacteriano, y especialmente a la actividad de lactobacilos y micrococos (Demeyer *et al.*, 1974). En este sentido Monteil (1991) observó en embutidos crudos curados una oxidación más intensa en los productos elaborados con cultivos iniciadores compuestos de *Staphylococcus carnosus* en combinación con *Lactobacillus sake*, *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus pentosaceus*, obteniendo mayores concentraciones de 2-alcanona, 3-metilbutanal y 3-metilbutanol en el producto final. También, Ordoñez *et al.* (1989) en embutidos fabricados con ingredientes mínimamente contaminados comprobó que la participación de los microorganismos era esencial para la formación de esteres, aunque no especifican los microorganismos involucrados. En estudios más recientes, se ha comprobado que en embutidos elaborados con *Staphylococcus xylosus* y *Staphylococcus carnosus*, se obtuvieron elevadas concentraciones de metilbutanal, metilcetonas y etil-esteres los cuales están relacionados con la formación del característico olor a curado de los embutidos crudos curados (Montel *et al.*, 1997).

Los procesos oxidativos en los productos crudos curados se ven afectados por muchos factores. En general, en los productos con valores de a_w de alrededor de 0,3 la oxidación lipídica es muy lenta, ya que se produce una reducción de la actividad de los catalizadores metálicos por destrucción de los radicales, favoreciendo el pardeamiento no enzimático (que da lugar a compuestos con actividad antioxidante), y/o impidiendo el acceso del oxígeno al alimento (Nawar, 1995). Sin embargo a actividades de agua más elevadas, entre 0,55 y 0,85, la velocidad de oxidación aumenta debido probablemente al aumento de la movilidad de los catalizadores presentes. Existen otros factores que favorecen la oxidación, por ejemplo el picado de la carne, ya que al romperse las membranas celulares se facilita el contacto con el oxígeno atmosférico. La sal también

favorece los procesos oxidativos de las grasas, provocado la ruptura del anillo de porfirina de la mioglobina, y liberando al medio iones ferrosos, además disminuye la solubilidad del oxígeno en la fase acuosa facilitando su acción oxidante. Entre los factores que inhiben la oxidación de la grasa se encuentra la presencia de nitritos, los cuales reaccionan con la forma hemínica de la mioglobina evitando que el ión ferroso se oxide, de esta manera se impide la acción oxidante del Fe^{+3} . También el ácido ascórbico por su acción reductora equilibra las cantidades de iones ferroso y férrico e inhibe la reacción actuando como agente quelante del oxígeno. La adición de especias como la pimienta (en el salchichón) y el pimentón (en el chorizo) también ejercen un efecto protector contra la oxidación de los embutidos curados (Lizarraga *et al.*, 1989; Berger *et al.*, 1990).

En la oxidación de las grasas también están implicados otros factores que condicionan la reacción. La composición de los ácidos grasos influye en la velocidad de oxidación, los ácidos grasos insaturados se oxidan antes que los saturados. Además la oxidación es más rápida cuando los ácidos grasos están en forma libre que cuando se encuentran esterificados. También una baja presión de oxígeno disminuye la velocidad de la reacción. Finalmente uno de los factores que más afecta es la temperatura, en general la velocidad de oxidación aumenta al aumentar la temperatura.

I. 4. 2. Modificaciones Físico-Químicas.

I. 4. 2. 1. Cambios en el pH

El pH es probablemente el parámetro más importante durante la fermentación de los embutidos crudos curados. La reducción del valor de pH supone una garantía en la higiene microbiana, además contribuye a la intensificación de la velocidad de desecación, facilitando la evaporación de agua en el rango próximo al punto isoeléctrico de las proteínas. Según Demeyer *et al.*

(1979) el pH de los embutidos crudos curados 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. Al final de la maduración se observa un ligero incremento del pH debido a la formación de amonio, al incremento de sustancias con capacidad tampón y a la disminución de la disociación de los electrolitos presentes, durante este período no hay correlación entre la producción de ácido láctico y el pH (List y Klettner, 1978).

El descenso de pH, que se produce como consecuencia de la acidificación, origina una serie de cambios muy beneficiosos que afectan a las características microbiológicas y sensoriales del producto. Pero 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 y 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 necesaria para

controlar el crecimiento de determinadas especies patógenas se reduce considerablemente. 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 (Castellani y Niven, 1955).

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 (Kröckel, 1995). Asimismo en los embutidos italianos, con cubierta de mohos superficial, el pH final se establece entre 6,0-6,2 (Marchesini *et al.*, 1992). En España los consumidores muestran una preferencia por productos poco ácidos, aunque el rango de pH entre el que se encuentran la mayor parte de embutidos españoles está comprendido entre 4,5-5,5 (Roncalés, 1994).

Cuando se elaboran embutidos de gran diámetro (80 mm), el descenso del pH puede ocurrir demasiado lento; en este caso es importante elegir al microorganismo iniciador más adecuado, se ha demostrado que *Lactobacillus curvatus* se instaura fácilmente como flora predominante en embutidos de calibre grueso (Bantleon, 1987; Gehlen, 1989).

Con el fin de establecer un mejor control del proceso de fermentación en presencia de cultivos iniciadores, Landvogt y Fischer (1990) 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 la 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 influye en la acidificación aunque sí lo hace la inoculación de un mayor número de células viables.

I. 4. 2. 2. Cambios en la actividad de agua (a_w)

Una de las características principales de los embutidos crudos curados 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, pero además la desecación provoca una disminución de la a_w inicial (próxima a 0,96) que reduce la disponibilidad del agua del alimento. En los productos de mezcla fermentados la a_w puede descender hasta valores que oscilan entre 0,894 para el chorizo de segunda clase y 0,784 para el salchichón de primera (Córdoba y Fernández-Salguero, 1988). Leistner y Wirth (1972) afirman que el rango de a_w para embutidos fermentados oscila entre 0,83 y 0,96 con una media de 0,91. Rojas *et al.* (1991) determinaron la a_w en jamón serrano obteniendo valores que oscilaban entre 0,84-0,95, con 0,90 como media al final de la maduración. 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 y 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 (no precisan refrigeración).

La carne fresca tiene una a_w próxima a 0,99 pero cuando va a utilizarse para la producción de embutidos crudos curados 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 parte de agua y permitirá llegar a los rangos de a_w finales (0,784-0,894).

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.

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 y de la temperatura y humedad relativa del aire. Es importante que exista un gradiente de humedad entre el interior del embutido y el aire circundante, pero cuando este gradiente es muy acusado se produce un secado muy intenso en la porción cortical que da lugar a la formación de una capa reseca, impermeable a la humedad, que impide la expulsión del agua del interior y por tanto no disminuye la a_w . En estas condiciones se ve favorecido el crecimiento de microorganismos indeseables y, como consecuencia, se pueden producir defectos de consistencia, alteración del enrojecimiento, aparición de huecos, agrietado y presencia de olores y sabores desagradables. (Frey, 1995).

I. 4. 2. 3. Consistencia

En los productos curados la consistencia está relacionada con la formación de una matriz cuyas propiedades dependen casi exclusivamente de las proteínas de la carne empleada como materia prima.

En 1958, Kotter y Prändl describieron por primera vez los procesos físico-químicos que explican la consistencia de estos productos. Durante el picado de la carne se produce una ruptura más o menos intensa de las fibras musculares y como consecuencia las proteínas de la carne quedan expuestas a la acción de la sal, la cual origina un aumento de la fuerza iónica que provoca la solubilización de las mismas. Las proteínas solubilizadas actúan como cemento de unión entre los componentes insolubles de la matriz proteica (partículas de carne y de grasa), orientándose sobre éstas de manera que sus grupos lipófilos se adsorben a las partículas de grasa y se aglutinan las partículas de carne (interacciones proteína-grasa y proteína-proteína). Posteriormente y debido al descenso del pH durante la acidificación, próximo al punto isoeléctrico de las proteínas, 5,3, se produce la insolubilización de las proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas y como consecuencia el sol que rodea a las partículas se convierte en un gel. La desnaturalización de las proteínas provoca una disminución de la capacidad de retención del agua lo cual favorece la desecación del producto. La progresiva desecación contribuye a la consolidación del gel y a la consistencia y textura del embutido.

El proceso de gelificación, necesario para que los productos crudos curados adquieran la consistencia que les caracteriza, es muy complejo y depende de varios factores como son: el trabajo mecánico, la concentración de sales y el pH. La masa cárnica antes de ser embutida es sometida a distintos tipos de trabajo mecánico, los más comunes son: mezclado, masajeado y malaxado. Todas estas operaciones se caracterizan por provocar una rotura celular que favorece la liberación de las proteínas miofibrilares, es decir, aumenta la extracción proteica. Posteriormente estas proteínas se solubilizan y se introducen en la estructura vacía de la fibra muscular, permitiendo una unión más firme entre la matriz proteica y la superficie de la carne. El pH tiene un doble papel en el proceso de gelificación, por un lado cuando aumenta se incrementa la solubilidad de las proteínas miofibrilares que actúan como solución ligante, pero

por otro lado el descenso del pH es imprescindible para que se produzca la formación del gel por insolubilización y precipitación de las proteínas, principalmente las sarcoplásmicas (Schmidt, 1994).

I. 4. 2. 4. Desarrollo del color

El color es una de las características más importantes de la carne, ya que es el principal atributo que juzga el consumidor antes de comprar cualquier producto cárnico. El curado de la carne se ha realizado tradicionalmente añadiendo sal (cloruro sódico) y se ha observado que además de la acción conservante se forma un color rojo en el producto final que es muy apreciado por los consumidores. Esta variación de color de la carne se ha denominado “enrojecimiento”. Este proceso incluye una serie de complejas reacciones en las que las bacterias presentes en el embutido reducen el nitrato a nitrito que, posteriormente y mediante reacciones químicas, es reducido a óxido nítrico, el cual reacciona con los pigmentos hemo de la carne para formar el deseado color rojo del curado. En la Figura 2, se muestran las principales reacciones implicadas en la reacción de enrojecimiento.

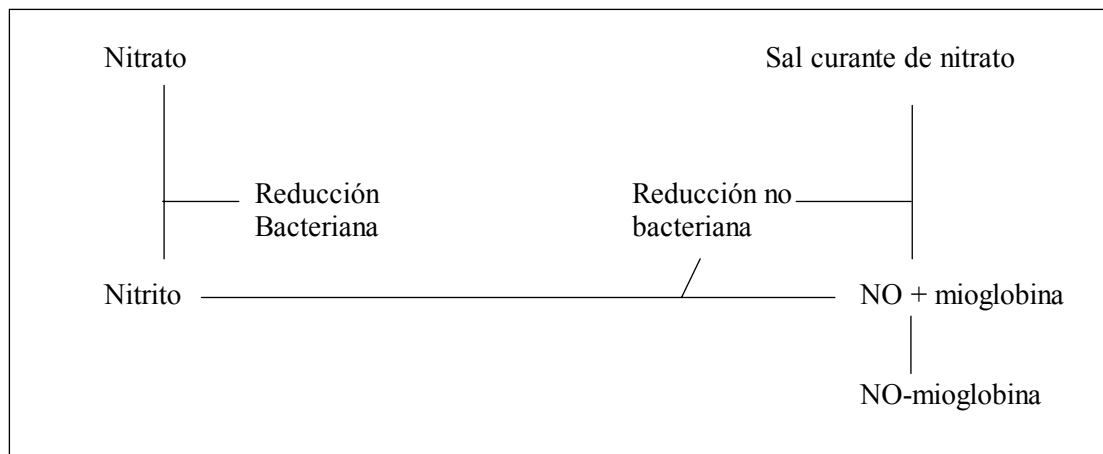


Figura 2.- Reacción de enrojecimiento (según Prändl, 1994)

El color normal de las carnes curadas depende de tres factores: la concentración de pigmentos en los tejidos, el grado de conversión del pigmento nitrosilado y el estado de las proteínas de la carne. Durante la maduración en el embutido crudo se encuentran simultáneamente diversos pigmentos (mioglobina, metamioglobina, nitrosomioglobina y nitrosomiocromógeno) formando una mezcla. El color resultante y la estabilidad del mismo dependen de la preponderancia cuantitativa de los diferentes compuestos coloreados.

El embutido crudo exhibe el color del curado cuando se ha transformado aproximadamente la mitad del pigmento en nitrosomioglobina o nitrosomiocromógeno, pero este color no se estabiliza hasta que no se consigue el 75 % del pigmento transformado. Por otro lado si las proteínas tisulares permanecen en su mayoría no desnaturalizadas y la estructura celular es relativamente traslúcida, la luz penetra profundamente en los tejidos obteniéndose coloraciones de la carne más oscuras, en cambio, si las proteínas están desnaturalizadas, son opacas, y reflejan más luz, originando coloraciones más claras.

En la carne fresca existen diversos pigmentos que influyen de forma decisiva en el color que adquiere el producto crudo tras el procesado. En la Tabla 9, se detallan el origen y características de los pigmentos presentes en la carne.

Los pigmentos hemo, mioglobina y hemoglobina hemática, son proteínas sarcoplásmicas que pueden encontrarse en distintos estados semiestables en la carne y van a ser los principales responsables de la coloración final de ésta. La mioglobina constituye el 50-80 % de los pigmentos cárnicos y se origina y localiza en el músculo. La hemoglobina es el pigmento de la sangre y constituye el 20-50 % de los pigmentos, se sintetiza en la médula ósea y aparece en los capilares, arterias y venas de la carne. Ambas moléculas se caracterizan por contener en su estructura un grupo hemo que les confiere su color.

Tabla 9.- Pigmentos de la carne (Fox, 1994).

Pigmento	Color	Origen	Comentarios
Pigmentos endógenos			
Hemínicos	Púrpura	Condiciones reductoras	Interior de las carnes frescas. Ausencia de aire.
Mioglobina			
Hemoglobina			
Oximioglobina	Rojo	Oxigenación	Superficie de la carne expuesta al aire
Metamioglobina	Pardo	Oxidación	Carne envejecida, bajas presiones de O ₂
Citocromos	Rojo		Concentraciones muy bajas, no contribuyen al color de la carne directamente
Flavinas	Amarillo		
Vitamina B ₁₂	Rojo		
Pigmentos endógenos de la grasa			
Carotenos	Amarillo		Animales alimentados con forraje
Catecolaminas	Pardo		Grasa parda de la espalda
Pigmentos ceroides	Pardo	Grasa/proteína	Animales viejos
Lipofuscina	Amarillo	Grasa/proteína	Base de Schiff fluorescente
Pigmentos de origen microbiano			
Fosforescente	Verde, azul, plateado	<i>Pseudomonas</i> <i>Achromobacter</i> <i>Micrococcus</i> <i>Photobacterium</i> <i>Bacterium</i> <i>Bacillus</i> <i>Vibrio</i>	Generalmente no se aprecia en refrigeradores bien iluminados
Fluorescente	Azul verdoso Crema, amarillo, verde Rojo	<i>Pseudomonas</i> <i>Halófilos</i> <i>Serratia</i>	Grasa del jamón
Pirroles	Azul púrpura	<i>S.violascieans</i>	Marcas púrpuras, manchas de tinta en grasa

El grupo hemo consta de dos fracciones, una orgánica y un átomo de hierro. La fracción orgánica o protoporfirina está constituida por cuatro grupos pirroles que se unen mediante puentes de meteno para formar un anillo tetrapirrólico. A este anillo se enlazan cuatro metilos, dos vinilos y dos propionatos, existen diversas formas de protoporfirina aunque sólo la Protoporfirina IX está presente en los sistemas biológicos. El átomo de hierro se localiza en el centro del anillo unido a los cuatro nitrógenos de la protoporfirina y puede formar dos enlaces adicionales uno a cada lado del plano hemo. Estas localizaciones se denominan 5ª y 6ª posición de coordinación. La 5ª está coordinada a una molécula de histidina contenida en la estructura de la proteína y la 6ª puede estar ocupada por otro residuo imidazol, por una molécula de agua o por un ligando como el oxígeno o el óxido nítrico. En la carne curada esta posición está ocupada por el óxido nítrico. En el tejido vivo los únicos factores que gobiernan la funcionalidad del grupo hemo son el estado de oxidación del hierro, la presión parcial de oxígeno y las ligeras modificaciones del pH. Sin embargo en la carne actúan otros factores que producen grandes cambios en la estructura que afectan al color de los pigmentos, estos se detallan en la Tabla 10:

Las sales curantes utilizadas para la elaboración de los embutidos contienen nitratos y nitritos de sodio y/o potasio que en el periodo inicial sufren una reducción bacteriana hasta nitritos que es llevada a cabo por microorganismos reductores presentes en la masa cárnica. Las bacterias implicadas en este proceso pertenecen fundamentalmente al grupo de las Micrococáceas (*Micrococcus* y *Staphylococcus*), aunque también participan otros grupos como *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Aerobacter*, *Achromobacter* y ciertas bacterias acidolácticas pertenecientes al género *Lactobacillus*. Las micrococáceas poseen la enzima nitrato reductasa que es necesaria para la reducción del nitrato a nitrito. Esta enzima se forma en la membrana citoplasmática de la célula

bacteriana y su actividad es relativamente estable dentro del rango de pH comprendido entre 4,9-6,0.

Tabla 10.- Factores que influyen en la funcionalidad del grupo hemo (Fox, 1994)

	Colores
Estado de oxidación del hierro	
Ferroso (Fe^{++})	Rojo o púrpura
Férrico (Fe^{+++})	Rojo o pardo
Ligandos y tipos de enlace	
Ninguno (sólo Fe^{++})	Púrpura
Fuerte (covalente coordinado)	Rojo
Débil (iónico)	Rojo-pardo
Estado físico de la proteína	
Nativo	Rojo, púrpura o pardo
Desnaturalizado	Rosa o pardo
Integridad del anillo porfirínico	
Intacto	Rojo, púrpura o pardo
Sustituido	Verde
Roto	Verde, pardo o amarillo

Se han estudiado las condiciones en las que se produce la máxima actividad de estas enzimas y se ha comprobado que en el caso de la nitrato reductasa producida por *Staphylococcus carnosus* la actividad óptima se produce cuando el valor de pH es de 6,0 y la temperatura de 44° C (Puolanne *et al.*, 1977); para el caso de la nitrato reductasa producida por diferentes cepas de *Micrococcus varians*, su actividad se vió afectada por la concentración de NaCl y la temperatura, variando considerablemente de una cepas a otras (Jessen, 1995).

Posteriormente también se ha demostrado la capacidad de *Staphylococcus* sp. para reducir los nitritos, lo cual confirma la presencia de la enzima nitrito reductasa (Hartmann *et al.*, 1995). También las bacterias lácticas poseen las enzimas nitrato y nitrito reductasa. Wolf y Hammes (1988) descubrieron que algunas cepas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus pentosus* poseen estas enzimas y otras cepas de *Pediococcus pentosaceus* poseen una enzima nitrito reductasa hemo dependiente. Sin embargo, no pudieron detectar actividad reductasa en cepas de *Lactobacillus curvatus* y era muy débil la encontrada en *Lactobacillus sake*. Recientes investigaciones confirman la participación de los microorganismos en la formación del pigmento del curado. Se ha puesto de manifiesto que, inoculando cepas de *Staphylococcus* aislados de jamón de Parma en embutidos a los que no se habían adicionados agentes curantes, se desarrolla un color rojo de curado similar al encontrado en el jamón de Parma (Morita *et al.*, 1996).

Paralelamente a este proceso de reducción de los nitratos se produce la fermentación de los carbohidratos a cargo de las bacterias lácticas que origina la acidificación del producto. A pH inferiores a 5,5 se produce la reducción de los nitritos a óxido nítrico, que puede producirse por la acción de microorganismos reductores o bien, de forma espontánea favorecida por la presencia de moléculas reductoras en el medio acidificado. Posteriormente el óxido nítrico se une a la mioglobina formando la nitroso-mioglobina o nitrosil-mioglobina que constituye el pigmento característico del curado. Este pigmento es más estable que la mioglobina original pero aún conserva gran parte de su reactividad, por lo que es fácil que sufra reacciones de oxidación que lo transforman en metamioglobina confiriendo un indeseable color marrón (Coretti, 1971).

Existen distintas teorías sobre el desarrollo de la reacción. Actualmente se utilizan principalmente dos modelos para explicar la reacción: uno basado en la

acción de los enzimas propios de la carne y otro en reacciones de tipo puramente químico.

La teoría enzimática (Walters *et al.*, 1967) establece que para la formación del pigmento del curado de la carne la metamioglobina se forma a partir de la oxidación de la mioglobina endógena por el nitrito. Según esta teoría el proceso de enrojecimiento se desarrolla como muestra la Figura 3.

Según este esquema, la oximioglobina (MbO_2) se oxida a metamioglobina (MetMb) pasando el átomo de hierro de estado ferroso (Fe^{2+}) a férrico (Fe^{3+}) y el nitrato implicado en la reacción se reduce a nitrito. A continuación la citocromo-oxidasa cataliza una reacción por la que el nitrito oxida el ferrocitocromo C a ferricitocromo C nitroso.

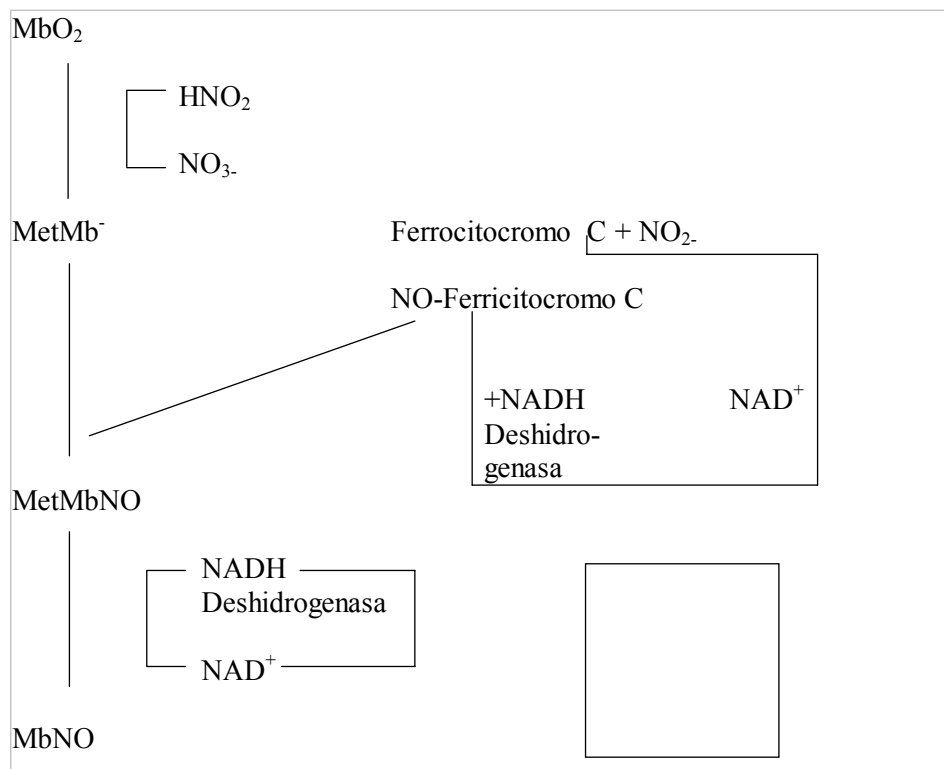


Figura 3.- Teoría enzimática para la formación del pigmento del curado (Prändl, 1994).

El grupo nitroso del ferricitocromo C nitroso se traspa a la metamioglobina, originándose nitrosometamioglobina (MetMbNO), mediante la acción de enzimas mitocondriales (NADH deshidrogenasa). Finalmente estas mismas enzimas reducen la nitrosometamioglobina a nitrosomioglobina. Esta reacción se ve favorecida por la concentración de nitrito que origina la rápida oxidación de la oximioglobina a metamioglobina.

Según la teoría no enzimática que se muestra en la Figura 4, propuesta por Möhler y Schereer (1979), en la formación del pigmento del curado de la carne todos los sistemas derivan de la metamioglobina, que es el primer producto formado en la cadena de reacciones. La metamioglobina reacciona con el nitrito formando nitrosometamioglobina que posteriormente por la acción de los grupos sulfhidrilo (-SH) se reduce a nitrosomioglobina.

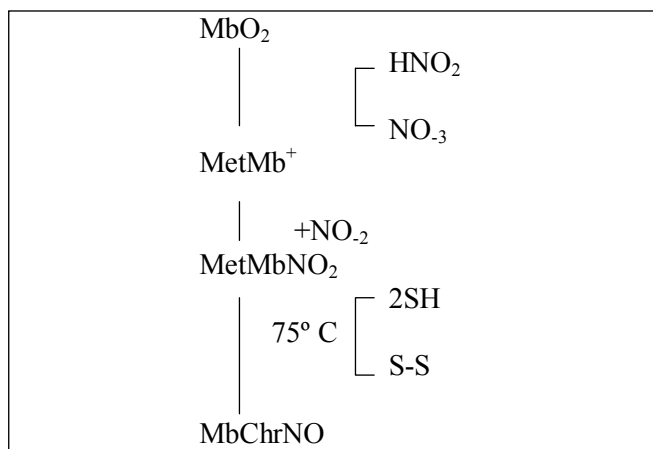


Figura 4.- Teoría no enzimática de la formación del pigmento del curado (Möhler y Schereer, 1979).

La reducción de la nitrosometamioglobina a nitrosomioglobina que provocan los grupos sulfhidrilo se produce bajo los efectos del calor (75° C), desnaturalizándose la porción proteica, la globina. La acción del calor provoca la

ruptura entre el núcleo hemo y la globina, favoreciendo la unión al hierro de una segunda molécula de NO. El pigmento obtenido es el nitrosomiocromógeno, también denominado rojo curado.

Los procesos de enrojecimiento nunca llegan a transformar toda la mioglobina en nitrosomioglobina, cuando se añade la suficiente cantidad de nitrito y el valor de pH es el adecuado se transforman aproximadamente dos tercios de la mioglobina de la carne. Existen diversos factores que actúan sobre la formación y estabilidad del color del embutido como son el potencial redox y la acidificación del producto. El descenso muy rápido del potencial redox provoca una deficiente estabilidad del color. También una elevada velocidad e intensidad de la acidificación puede provocar la inhibición de los microorganismos implicados en la reducción de los nitratos, provocando coloraciones indeseables en el embutido, aunque un proceso de acidificación adecuado es imprescindible para que se produzca la reducción de los nitritos a óxido nítrico. La elevada reactividad del nitrito le lleva a una reducción considerable de su concentración efectiva, un nivel inicial de nitrito de aproximadamente 100 ppm es reducido a 10-20 ppm después de diez días de fermentación y a menos de 10 ppm después de 30 días de maduración (Wirth, 1991).

La adición de sustancias reductoras como el ácido ascórbico o el ascorbato sódico puede potenciar notablemente el enrojecimiento, ya que favorece la reducción del nitrito a óxido nítrico y del Fe^{3+} de la metamioglobina a Fe^{2+} de la oximioglobina. Permitiendo de esta forma reducir las cantidades de nitrito teóricamente necesarias para la transformación de la mioglobina en nitrosomioglobina.

Además del desarrollo y fijación del color característicos de curado, el nitrito desempeña otras funciones: inhibe el crecimiento de numerosos microorganismos alterantes y patógenos (fundamentalmente *Clostridium botulinum*), contribuye en el desarrollo del flavor de curado y posee propiedades

antioxidantes, retardando la formación de aromas desagradables. Sin embargo la gran problemática es el nivel de nitrito residual en los productos cárnicos, ya que se le ha considerado un precursor de compuestos N-nitroso carcinógenos (nitrosaminas). Esto ha llevado a los gobiernos de los distintos países productores de embutidos, que utilizan los nitratos y nitritos como sales curantes, a establecer límites en la adición de estas sustancias. En España la Legislación Alimentaria establece una cantidad inicial de 150 ppm de nitrito y 300 ppm de nitrato y permite un nivel máximo residual de 50 y 250 ppm de nitrito y nitrato, respectivamente (Presidencia del Gobierno, 1997). Al final del proceso de elaboración de los productos crudos curados sólo puede detectarse alrededor del 10-20 % del nitrito original añadido, dependiendo del tipo de producto de que se trate los niveles de nitrito residual oscilan generalmente entre 5 y 30 ppm de nitrito (Cassens *et al.*, 1979).

Son numerosas las investigaciones que a partir de la década de los 70 han demostrado que los nitritos pueden formar nitrosaminas cancerígenas, particularmente en bacon (Rubin, 1977, Cassens *et al.*, 1979; Hotchkiss y Cassens, 1987; Cassens, 1997). Esto ha llevado a la búsqueda de sustitutos del nitrito en el curado de la carne, donde desempeña una triple función: promotor del color, agente antioxidante e inhibidor bacteriano. La dificultad en encontrar una sustancia que reúna estas cualidades ha obligado a desarrollar un sistema multicomponente para el curado de la carne sin nitrito (Rubin *et al.*, 1985; O'Boyle *et al.*, 1990; Rubin *et al.*, 1990).

Se acepta que una de las sustancias que participa en gran medida en el color de la carne curada es el dinitrosil-ferrohemocromo (DNFH) que se forma al calentar la nitrosil-mioglobina. Sin embargo algunos autores afirman que el pigmento final es el complejo mononitrosil-ferrohemocromo (Killday *et al.*, 1988; Jankiewicz *et al.*, 1990). El dinitrosil-ferrohemocromo puede prepararse fácilmente a partir de la hemoglobina presente en las células sanguíneas de

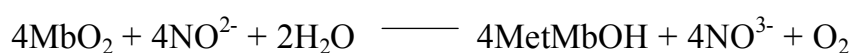
bóvidos, que es un tetrámero similar a la mioglobina, y su obtención puede realizarse en dos etapas con excelente rendimiento y elevada pureza. Este pigmento del curado “sintético” es inestable a la luz y al aire, al igual que el formado a partir de nitrito en la carne, y para protegerlo se puede encapsular en una matriz de carbohidratos, de esta forma podría almacenarse durante un año ó más (Shahidi *et al.*, 1984; 1985). Por otro lado, Pegg y Shahidi (1997) han desarrollado el Preformed Cooked Cured Meat Pigment (CCMP), un pigmento de estructura idéntica al complejo mononitrosil-ferrohemocromo y que podría sustituir al nitrito para la formación del color curado en sistemas cárnicos libres de nitritos.

En cuanto a la acción antioxidante del nitrito se sabe que actúa bloqueando la oxidación de los lípidos casi completamente (Shahidi *et al.*, 1988), así se evita la formación de un amplio espectro de compuestos carbonilos que enmascararían el flavor de los productos curados. Sin embargo, existen otros compuestos que pueden actuar de esta forma, se ha comprobado la eficacia de muchos antioxidantes, agentes quelantes y combinaciones de estos (Shahidi *et al.*, 1987). Entre ellos destacan el tripolifosfato sódico (TPPS) y el ascorbato sódico que unidos forman una combinación eficaz y sinérgica de alta capacidad antioxidante, su acción además se puede incrementar por la presencia en cantidades trazas de antioxidantes fenólicos como el t-butil-hidroquinona (TBHQ) o el butil-hidroxianiso (BHS) (O’Boyle *et al.*, 1990).

Finalmente el nitrito es un importante agente antimicrobiano, especialmente previene el crecimiento de *Clostridium botulinum* en carnes curadas (Sanz *et al.*, 1997b). Afortunadamente existen otras sustancias que pueden sustituir al nitrito en esta acción. Se han ensayado numerosos compuestos entre los que destacan el sorbato potásico, hipofosfito sódico y monometil y dimetil fumarato, y se ha comprobado que el hipofosfito sódico en una concentración de 3000 ppm tiene un efecto conservador muy parecido al nitrito

(Wood *et al.*, 1986). Esta sustancia es una sal cristalina soluble y de sabor suave que disfruta del status GRAS en EEUU, se ha ensayado en salchichas tipo Viena y en jamón cocido, no obstante, se está estudiando el empleo de otras sustancias conservantes como el lactato sódico (Anders y Milowski, 1987; Anders *et al.*, 1989).

Los productos intermediarios del proceso de enrojecimiento son muy reactivos, el óxido nítrico puede dar lugar a complejos no sólo con la mioglobina, sino también con otros compuestos que llevan anillos porfirínicos, como la hemoglobina, catalasas, peróxidos y citocromos. Durante la etapa de estufaje, que coincide con el desarrollo microbiano y el proceso de acidificación de la masa, se ha observado que en la masa de embutidos elaborados exclusivamente con nitritos aparecen nitratos que se forman a partir del nitrito añadido (Sarasibar *et al.*, 1989). Este fenómeno fue descrito previamente por Cassens *et al.*, (1979) que propone un mecanismo para explicar este suceso. Sugiere que la primera reacción del nitrito es la oxidación de la mioglobina a metamioglobina con la simultánea producción de nitrato en una reacción autocatalítica, como muestra la siguiente ecuación:



I. 4. 3. Modificaciones Microbiológicas

I. 4. 3. 1. Evolución de los principales grupos microbianos

En los capítulos precedentes se ha detallado como la flora presente en los embutidos crudos curados es en gran parte responsable de los cambios químicos y bioquímicos producidos durante la maduración de la masa cárnica inicial.

También se ha mencionado que estos microorganismos beneficiosos pueden añadirse como cultivos iniciadores con el fin de dirigir la fermentación y evitar posibles defectos. No obstante, es posible producir excelentes embutidos sin la adición de cultivos iniciadores, siempre que se sigan las buenas prácticas de elaboración y se mantengan las condiciones de maduración apropiadas (Leistner, 1995).

La carne utilizada como materia prima en la fabricación de embutidos contiene una flora microbiana muy variada a la que se suma la aportada por el resto de ingredientes y la derivada de las operaciones de manipulación. Tras la preparación de la masa cárnica la carga microbiana inicial no supera 10^6 ufc/g y se compone básicamente de bacilos psicotrofos Gram negativos como *Pseudomonas*, *Achromobacter* y *Flavobacterium*; enterobacterias psicotrofas, levaduras y mohos. También se pueden encontrar, aunque en menor número, microorganismos Gram positivos, como bacterias lácticas y micrococáceas, que serán las responsables de los principales cambios producidos en el embutido. En cuanto a los microorganismos patógenos se han detectado algunas especies como *Salmonella* sp, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* y *Staphylococcus aureus*. Su presencia generalmente se atribuye a una deficiente higiene y/o a una inadecuada manipulación de las materias primas durante su procesado. Las primeras horas tras la elaboración son críticas para estos microorganismos, ya que existen unas condiciones de elevado pH y a_w que favorecen el crecimiento de estas especies.

Durante la fase de estufaje los embutidos son mantenidos a temperaturas entre 20-27° C y humedad relativa en torno a 90 % durante aproximadamente 48 horas. Estas condiciones van a favorecer el desarrollo de la flora Gram positiva aunque también estimulan el crecimiento de las especies patógenas. En esta fase se inician dos de los fenómenos que van a condicionar todo el proceso y donde el papel que desempeñan las bacterias es fundamental, estos son la reducción de los

nitratos a cargo de las micrococáceas y la fermentación de los azúcares a cargo de las bacterias lácticas. La primera se realiza durante las 24 horas iniciales, cuando los niveles de ácido láctico aún no inhiben la acción reductora de las micrococáceas. Estas alcanzan niveles cercanos a 10^6 ufc/g en los primeros días para ir decreciendo a medida que se va acidificando el embutido y se instauran las condiciones de microaerofilia, la reducción más notable se produce a partir de los 15-20 días de maduración. Paralelamente se produce un incremento del número de lactobacilos que llegan a alcanzar niveles de hasta 10^8 ufc/g constituyéndose como flora predominante y manteniéndose hasta el final del proceso. La drástica caída del pH (hasta valores de 5,3-5,4) que se produce en los primeros días de la maduración, por la producción de ácido, crea unas condiciones digenésicas para la flora contaminante y patógena que incluso puede llegar a desaparecer.

Tras el estufaje comienza la maduración, propiamente dicha, donde los valores de temperatura y humedad relativa se reducen sensiblemente. Durante esta etapa se produce la deshidratación del producto, que pierde hasta un 40 % del peso inicial, esto conlleva un descenso de la a_w que también contribuye a crear unas condiciones desfavorables para el crecimiento de la mayor parte de la flora indeseable. La flora láctica es la que mejor soporta estas condiciones de acidez y desecación.

En un plazo de pocos días, las bacterias lácticas se instauran como flora predominante de la maduración en el embutido crudo curado. Asimismo, los bacilos Gram negativos llegan a desaparecer después de un período de 8-10 días. No obstante en los procesos de maduración lenta (poca adición de azúcar y bajas temperaturas de estufaje, en torno a 18° C) la flora Gram negativa dispone de un ambiente más favorable para su crecimiento y no desaparecen en el curso de la maduración (Lücke, 1985).

Cuando se añaden cultivos iniciadores las diferencias más apreciables se producen en las primeras fases del proceso. Las bacterias lácticas presentan una fase de latencia antes de que comience la producción de ácido, cuya duración depende del número inicial de bacterias adaptadas a las condiciones imperantes. La adición de cultivos iniciadores supone un aporte extra de bacterias (no inferior a 10^6 ufc/g) que permite acortar esta fase logarítmica y asegurar la viabilidad de los microorganismos presentes, asegurando además la correcta acidificación del producto. También la adición de especies reductoras (*Micrococcus* y/o *Staphylococcus*) durante el amasado permite obtener recuentos mayores en las primeras fases del proceso.

Como se ha mencionado anteriormente es en esta fase inicial cuando se produce la reducción de los nitratos a nitritos. No obstante, si obviamos estas primeras etapas del proceso las diferencias microbiológicas en las etapas posteriores no son importantes con respecto a los embutidos sin cultivos.

I. 4. 3. 2. Riesgos higiénicos de los embutidos crudos curados

Los embutidos crudos curados en algunas ocasiones han estado implicados en toxiinfecciones alimentarias por *Staphylococcus aureus* (Lücke, 1985). Este microorganismo procede generalmente de una inadecuada manipulación y se caracteriza por ser halotolerante, tolerante a los ácidos y capaz de crecer a baja a_w , indistintamente, bajo condiciones anaeróbicas o aeróbicas. Además puede producir enterotoxinas a las temperaturas establecidas durante el estufaje, aunque sólo en condiciones de aerobiosis. Sin embargo, estos microorganismos son pobres competidores frente a otras bacterias presentes en la carne lo cual reduce considerablemente el riesgo sanitario (Martínez *et al.*, 1982).

Los casos de salmonelosis atribuidos a embutidos fermentados son poco frecuentes (Silliker and Gabis, 1986; Munuera *et al.*, 1991; Torregrosa *et al.*,

1994), no obstante existen numerosos factores que favorecen el crecimiento de enterobacterias durante la maduración de los embutidos y que incrementan el riesgo, entre los que se incluyen la elevada a_w inicial, el alto pH inicial, la baja concentración de carbohidratos fermentables, el bajo número de lactobacilos en la masa cárnica inicial, el uso de nitrato o de bajos niveles de nitrito como agentes del curado y las altas temperaturas de maduración. Sin embargo, estos microorganismos no suelen encontrarse en los productos cárnicos crudos curados ya que no soportan las condiciones de pH ácido y baja a_w reinantes.

Otra especie patógena que ha sido aislada de productos crudos curados es *Listeria monocytogenes* (Nicolas, 1985; Glass y Doyle, 1989; Farber *et al.*, 1989; Benezet *et al.*, 1993). Este microorganismo es capaz de crecer a pH ácido y es halotolerante, por lo que resiste bien las condiciones que existen en el embutido, además puede crecer a temperaturas de refrigeración. No obstante sólo se han detectado porcentajes de contaminación mínimos en este tipo de productos. Esto hace suponer que la combinación de factores como pH, sal, nitritos y a_w inhibe el desarrollo de esta especie en los productos crudos curados

En relación con la inocuidad de las bacterias lácticas, que han sido consideradas como no patógenas, hace unos años aparecieron algunas especies de lactobacilos (*Lactobacillus rhamnosus*, *L. casei* y *L. plantarum*) involucradas en infecciones clínicas relacionadas con procesos de endocarditis (Aguirre y Collin, 1993; Gasser, 1994). Estos descubrimientos crearon recelos sobre el empleo de cultivos iniciadores compuestos con bacterias lácticas, sin embargo en recientes investigaciones Skovgaard (1996) afirma que las bacterias lácticas incluidas en los preparados de cultivos iniciadores no han estado nunca ligadas a procesos patológicos en el hombre y que por tanto los cultivos iniciadores no constituyen un riesgo para la salud.

I. 5. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

El estudio de los embutidos crudos curados se justifica tanto desde un punto de vista comercial y de producción como científico. Además es una de las líneas de trabajo de nuestro Grupo de investigación AGR 120 catalogado en el Plan Andaluz de Investigación y denominado “Lactología y Tecnología de la Carne”.

Desde el punto de vista comercial, el salchichón es, junto al chorizo, uno de los embutidos crudos curados de mayor producción en España (AICE, 1999). Pese a la existencia de algunas industrias de fabricación a gran escala, la elaboración de estos productos sigue siendo en muchos casos artesanal, en pequeñas industrias de carácter familiar. En ambos casos, la técnica de conservación implicada es la misma, y consiste en un sistema de procesos combinados en el que participan numerosos factores.

Uno de los retos de los investigadores, actualmente, es la búsqueda de nuevos obstáculos que ayuden a la conservación de estos productos. La posible utilización de bioconservadores ha despertado un notable interés entre los industriales, ya que se trata de productos de origen biológico que podrían incrementar la seguridad facilitando una producción con las máximas garantías.

Basándonos en estos aspectos se inició este trabajo con el fin de realizar un estudio comparativo de los parámetros químicos y físico-químicos de distintos lotes de salchichones adicionados de cultivos lácticos y bioconservadores comerciales. También se estudiaron los distintos grupos de microorganismos, tanto los involucrados en la maduración como los alterantes y patógenos, con el fin de valorar la posible acción bioconservadora de los productos añadidos. Finalmente se realizó una evaluación sensorial para definir las características organolépticas de los distintos lotes de salchichones y poder identificar las

posibles diferencias que originaban la adición de uno u otro tipo de cultivo láctico.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

II. MATERIAL Y METODOS

II. 1. MATERIAL

II. 1. 1. Material general de laboratorio

Los análisis realizados en este trabajo requirieron la utilización de una amplia gama de material de vidrio de uso común en laboratorios de análisis físico-químico y microbiológico. Los reactivos utilizados para los análisis físico-químicos, de calidad "purísimo" (PRS), fueron suministrados por las firmas comerciales Merck, Panreac y Sigma; y los medios de cultivo y suplementos para microbiología por ADSA-Micro, Merck y Oxoid. Para la preparación de los medios de cultivo y soluciones acuosas se utilizó agua destilada o desionizada.

La analítica desarrollada en esta trabajo se llevó a cabo con el siguiente equipo instrumental:

- Agitador de tubos **Ika-Vibro-fix**.
 - Agitador magnético **P-Selecta Agimatic 243**.
 - Arcón congelador **Liebherr**.
 - Autoclave **P-Selecta Autotester 437 G**.
 - Balanza analítica **Metler Toledo H 10 TW**.
 - Balanza de precisión **Sartorius 2254**.
 - Baño termostático **B. Braun. Thermomix 1441**.
 - Batería calefactora **Electrotherm**.
 - Cámara climática **ASL B-3-400**.
 - Campana de flujo laminar **Burdinola AV-100**.
 - Centrífuga **P-Selecta Centromix** y centrífuga refrigerada **Heraeus Labofuge 400**.
 - Cronómetro analógico **Dolmy**.
 - Destilador-desionizador **Elga**.
-

- Equipo **Tecator** provisto de un sistema de digestión **6 1007 Digester** y una unidad de destilación **Kjeltec 1002**.
- Equipo Soxhlet con 6 cámaras de extracción **Selecta**.
- Espectrofotómetro **Beckman UV/VIS DU-64**.
- Estufas de cultivo **P-Selecta** de fluctuación térmica $\pm 1^\circ \text{C}$ y estufa de CO_2 **Incubator CO_2** de fluctuación térmica $\pm 3^\circ \text{C}$.
- Estufa de desecación **Selecta** con una fluctuación térmica de 1°C .
- Frigorífico combi **Crolls**.
- Higrómetro de punto de rocío **CX-1**.
- Homogeneizador **Blander Stomacher 400** y **Sorval Omni-mixer 17106**.
- Horno de mufla con pirómetro **Heraeus MR 170**.
- Picadora **Moulinex 320 MX**.
- pH-metro digital **Beckman 3500** con electrodo combinado.
- Pipeta automática **Nichiryo Nichiper 5000DG** (10-100 μl) y **Biochit Proline** (200-1000 μl).
- Placas calefactoras **Combimax Selecta**.
- Placas calefactoras magnéticas **P-Selecta Univeba 400** y **P-Selecta Multimatic-5N**.
- Rotavapor **Heidolph OB 2001**, conectado a una trompa de agua **Heidolph VV 2001**.

II. 1. 2. Material experimental

Como material experimental se utilizaron un total de 210 salchichones "tipo casero" que se distribuyeron en 3 partidas de 70 piezas cada una. En cada partida se diferenciaron 5 lotes, dos de ellos se adicionaron con cultivos iniciadores comerciales, otros dos se adicionaron de bioconservadores y otro, al que no se le adicionó nada, se consideró el control.

Las 3 partidas de salchichones se elaboraron en la planta piloto de la empresa PROANDA S.L. situada en Sevilla. La primera partida se fabricó y maduró en febrero de 1997, la segunda en noviembre de 1997 y la tercera en abril de 1998. Una vez embutidas las piezas fueron transportadas hasta el laboratorio del Departamento, donde fueron maduradas en cámara climática con regulación automática de la temperatura y humedad relativa. En el siguiente esquema se muestran los diferentes lotes de salchichones elaborados:

TIPO DE PRODUCTO	LOTE	FABRICACION	SUBLOTE
Sin cultivo	A	Febrero 1997	A.1
		Noviembre 1997	A.2
		Abril 1998	A.3
Bioconservador 1	B	Febrero 1997	B.1
		Noviembre 1997	B.2
		Abril 1998	B.3
Bioconservador 2	C	Febrero 1997	C.1
		Noviembre 1997	C.2
		Abril 1998	C.3
Cultivo iniciador comercial 1	D	Febrero 1997	D.1
		Noviembre 1997	D.2
		Abril 1998	D.3
Cultivo iniciador comercial 2	E	Febrero 1997	E.1
		Noviembre 1997	E.2
		Abril 1998	E.3

En la elaboración de los lotes D y E se utilizaron dos cultivos iniciadores para fabricación de embutidos crudos curados suministrados por la firma Texel (Rhône-Poulenc). Se presentan liofilizados envasados al vacío y con un contenido de $4,5 \times 10^{11}$ células/g, se conservaron en refrigeración hasta su utilización. El cultivo que se utilizó para inocular los salchichones del **lote D** esta compuesto por las especies *Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus xylosus* y *Staphylococcus carnosus* en proporción 1:1:1. Se reconstituyó con agua y se

añadió a la masa cárnica según las recomendaciones del fabricante. Los embutidos del **lote E** se inocularon con otro cultivo compuesto por los mismos microorganismos en proporción 2:1:1.

Los embutidos del **lote B** se inocularon con un bioconservador comercial suministrado por la empresa PROANDA S.L. Este producto se obtiene de la fermentación de una especie de *Lactobacillus* sobre un medio de cultivo selectivo para lactobacilos y se presenta en forma líquida. Se añadió al 1 % a la masa cárnica junto con el resto de ingredientes.

Los embutidos del **lote C** se inocularon con otro bioconservador que produce Wesman Foods, Inc., Oregón. Se obtiene de la fermentación de leche desnatada por *Propionibacterium shermanii* y posteriormente es pasteurizado (Daeschel, 1989). Este producto se presenta liofilizado y se reconstituye con agua, también se adicionó al 1 % según recomendaciones del productor.

II. 2. METODOS

II. 2. 1. Elaboración de los embutidos

La elaboración de los salchichones se realizó siguiendo las técnicas de fabricación tradicionales con los ingredientes que se relacionan en la Tabla 11. Todos estos ingredientes fueron mezclados y amasados en una amasadora a vacío y a continuación se embutieron en tripa fibral de colágeno de 60 mm de diámetro. Se elaboraron piezas que pesaron entre 500-750 g. Tras el embutido los salchichones se sumergieron durante unos segundos en un cultivo fúngico de flora de superficie, constituido por la especie *Debaryomyces hansenii*, suministrado por Rhône-Poulenc.

Tabla 11: Ingredientes para la fabricación de los salchichones.

Ingredientes	Dosis
70 %	Magro de cerdo picado en placa de 8 mm
30 %	Panceta de cerdo picada en placa de 5 mm
21 g/kg	Sal común
18 g/kg	Azúcares
4,5 g/kg	Pimienta
2 g/kg	Polifosfatos
2 g/kg	Sales nitrificantes
1 g/kg	Nuez moscada molida

A continuación los embutidos se introdujeron en la cámara climática donde se establecieron las siguientes condiciones de temperatura y humedad relativa:

Estufaje

Temperatura.....20° C

Humedad Relativa.....95 %

Tiempo.....48 horas

Maduración o Secado

Temperatura.....12° C

Humedad Relativa.....80 %

Tiempo.....28 días

Los diferentes análisis físico-químicos, microbiológicos y sensoriales que se realizaron en las siguientes etapas:

- ◆ 1ª.- Amasado (día 0). Antes de embutir la masa cárnica
- ◆ 2ª.- Estufaje (día 2). Después del período de estufaje
- ◆ 3ª. - Primera semana de maduración (día 9)
- ◆ 4ª. - Segunda semana de maduración (día 16)
- ◆ 5ª. - Tercera semana de maduración (día 23)
- ◆ 6ª. - Cuarta semana de maduración (día 30)

II. 2. 2. Métodos para análisis microbiológico

II. 2. 2. 1. Preparación de muestras y diluciones

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 salchichón y homogeneizando con 90 ml de una solución de citrato sódico al 10 % (p/v), previamente calentado a 45° C, en Stomacher durante dos minutos. A continuación se prepararon las sucesivas diluciones decimales seriadas en agua de peptona estéril al 0,1 %.

Para el estudio de *Salmonella*, *Shigella* y *Listeria monocytogenes* la dilución inicial se realizó sobre 25 Gramos de muestra y 225 ml de diluyente.

II. 2. 2. 2. Enumeración de bacterias aerobias mesófilas

El recuento de bacterias aerobias mesófilas se realizó según recomendaciones de la APHA (1985). La siembra se realizó depositando, por duplicado, 1 ml de la dilución correspondiente en placas de Petri estériles, adicionando seguidamente 10-15 ml de agar para recuento en placa, previamente

licuado y enfriado a 45-50° C. Para homogeneizar el inóculo se realizaron movimientos circulares y de vaivén y una vez solidificado, se incubó a 30° C durante 72 horas. Tras el período de incubación se efectuó el recuento de colonias viables expresando el resultado como logaritmo de unidades formadoras de colonias por Gramo de muestra.

II. 2. 2. 3. Determinación de la flora láctica

El recuento de flora láctica se realizó según recomendaciones de la APHA (1976). La siembra se realizó por homogeneización en masa de 1 ml de la dilución correspondiente en agar MRS acidificado a pH 5,5 con una solución de ácido acético al 10 % e incubando a 37° C durante 24 horas en una estufa con una atmósfera del 10 % de CO₂.

La identificación por géneros de la flora láctica se efectuó mediante las siguientes pruebas:

- 1.- **Morfología:** se determinó en preparaciones en fresco sobre placas de agar MRS sembradas.
 - 2.- **Tinción de Gram:** se realizó a partir de cultivos de agar PCA incubado a 30° C durante 18 horas.
 - 3.- **Producción de catalasa:** partiendo de un cultivo crecido en caldo BHI incubado durante 18 horas a 30° C, se deposita una muestra del cultivo sobre un portaobjetos y se añade una gota de H₂O₂ al 3 %. La producción de catalasa se evidencia por la aparición de burbujas de O₂.
 - 4.- **Producción de CO₂ a partir de glucosa:** la fermentación de la glucosa por parte de los microorganismos origina la formación de gas. Esto se evidenció inoculando 2-3 gotas de un cultivo crecido en un tubo con caldo
-

Elliker (ADSA-Micro 2-288) adicionado de un 1 % de glucosa y con una campanita de Durham. Tras incubar a 30° C durante 7 días la aparición de burbujas en la campanita indica un resultado positivo.

5.- **Desaminación de la arginina:** la capacidad de algunos microorganismos de hidrolizar la arginina se evidenció añadiendo a un cultivo crecido, en caldo Elliker adicionado de un 0,3 % de monoclóhidrato de L-arginina e incubado a 30° C, una gota de reactivo de Nessler y realizando la observación sobre un papel de filtro blanco. La aparición de color rojo-anaranjado indica un resultado positivo. La prueba se repitió a los 3 y 7 días.

6.- **Crecimiento a diferentes temperaturas (10, 40 y 45 ° C):** se utilizó caldo Elliker incubado a las diferentes temperaturas.

7.- **Test de Voges-Proskauer:** consiste en detectar la producción de acetoina a partir de glucosa, se siguió la técnica descrita por Reuter (1970). A un cultivo crecido en caldo VPRM (Voges-Proskauer Rojo de Metilo, ADSA-Micro 2-207) se añade Reactivo de alfa-naftol para Voges-Proskauer (ADSA-Micro 6-027) hasta que el medio adquiriera un aspecto lechoso. A continuación se añade el reactivo de O'Meara para Voges-Proskauer (ADSA-Micro 6-006) hasta que desaparezca el aspecto lechoso y se agita enérgicamente. La aparición de un color rosado-violáceo indica que la prueba es positiva.

La diferenciación de géneros se realizó de acuerdo a las características descritas en la Tabla 12.

Tabla 12: Criterios para la identificación de las bacterias lácticas.

	Morfología Gram	Producción de gas	Hidrólisis arginina	Producción acetoina	Crecimiento a distintas Tª
Lactobacilos	Bacilos +	+	+	-	10, 40 y 45° C
Lactococos	Cocos +	-	-	+/-	10 y 40° C
Leuconostoc	Cocobacilos+	+	-	+/-	40° C
Pediococos	Cocos +	-	+/-	+	10, 40 y 45° C

II. 2. 2. 4. Enumeración de micrococos

Para el recuento de los micrococos se sigue el procedimiento descrito por Chapman (1945), según el cual, la siembra se realiza por homogeneización en masa inoculando 1 ml de la dilución correspondiente y añadiendo agar MSA (Manitol Salt Agar, Oxoid CM85) que se homogeneiza con movimientos de vaivén. Posteriormente se incubaba a 30° C durante 72 horas.

Las colonias típicas de micrococos aparecen rodeadas de halos de color amarillo brillante. Sobre estas se realizan las siguientes pruebas de confirmación:

- 1.- **Morfología:** se determina en preparación en fresco de cultivos en caldo BHI incubados durante 18 horas a 30° C.
- 2.- **Tinción de Gram:** se realiza a partir de un cultivo en agar PCA incubado durante 18 horas a 30° C.
- 3.- **Producción de catalasa:** se depositó sobre un portaobjetos una muestra de un cultivo crecido en caldo BHI incubado durante 18 horas a

30° C y se añadió una gota de H₂O₂ al 3 %. La producción de catalasa se evidenció por la aparición de burbujas de O₂.

II. 2. 2. 5. Enumeración de *Staphylococcus aureus* y estafilococos no patógenos.

El recuento de *Staphylococcus aureus* y estafilococos no patógenos se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Buttiaux (1974). La siembra en superficie se realizó extendiendo, con un asa de vidrio esteril, 0,1 ml de la dilución correspondiente sobre agar Baird Parker (Oxoid CM275) suplementado con una emulsión de yema de huevo-telurito (Oxoid SR54). Las placas se incubaron a 37° C durante 24-48 horas.

La presencia de *Staph. aureus* se evidenció por la aparición de colonias de color negro azabache, brillantes, convexas, de 2-3 mm de diámetro y rodeadas de un halo de precipitación transparente. Junto a estas colonias aparecen otras también de color negro pero de menor diámetro y que carecen de halo de precipitación, su recuento permitió determinar el crecimiento de estafilococos no patógenos. Para la confirmación de las colonias de *Staph. aureus* se realizaron las siguientes pruebas:

1.- **Investigación de la coagulasa:** las colonias típicas se sembraron en caldo BHI y se incubaron a 37° C durante 24 horas. Una vez crecido se tomó 0,1 ml del cultivo y se depositó en tubos Wasserman a los que se añadieron 0,3 ml de plasma de conejo-EDTA reconstituido (Merck, 1.13306) y se incubaron a 37° C durante 6 horas. La reacción se consideró positiva cuando el coágulo formado era firme.

2.- **Investigación de la Desoxirribonucleasa (DNA-asa):** Las colonias seleccionadas se sembraron en estría sobre agar DNA-asa (Oxoid CM321)

y se incubaron a 37° C durante 24 horas. Sobre las estrías crecidas se añadieron unas gotas de ácido clorhídrico 1 N. La aparición de una zona transparente sobre el cultivo crecido indica la liberación de desoxirribonucleasa y por tanto la reacción es positiva.

II. 2. 2. 6. Enumeración de enterobacteriaceas totales

Para el recuento de enterobacterias se siguió el procedimiento recomendado por la APHA (1985). La siembra se realizó por homogeneización en masa, depositando 1 ml de la dilución correspondiente en placas de Petri estériles y añadiendo 10-15 ml de agar VRBG (Agar Bilis Lactosa Glucosa Rojo Neutro Cristal Violeta, Oxoid CM485), se homogeneizó mediante movimientos circulares y de vaivén y una vez solidificado, se añadió una segunda capa de medio de cultivo. Se incubó a 37° C durante 24 horas.

El crecimiento de enterobacterias en este medio origina colonias de color violeta rojizo por fermentación de la glucosa con formación de ácido y con halos del mismo color por fermentación de los ácidos biliares del medio. Posteriormente se realizaron las siguientes pruebas de confirmación:

- 1.-**Morfología:** se determina sobre preparaciones en fresco de cultivos en caldo BHI incubados durante 18 horas a 30° C.
 - 2.-**Tinción de Gram:** se realizó a partir de una siembra en placas de agar PCA incubadas a 30° C durante 18 horas.
 - 3.-**Prueba de la citocromo-oxidasa:** la citocromo oxidasa es una enzima que no poseen las enterobacterias. La detección de esta enzima se realiza añadiendo tres gotas del reactivo citocromo-oxidasa (disolviendo 100 g de N-dimetil-parafenildiamina en 100 ml de agua destilada) a un cultivo del microorganismo problema crecido sobre agar PCA. La reacción se
-

considera positivas cuando en la mezcla aparece una coloración violeta oscuro.

II. 2. 2. 7. Enumeración de coliformes totales

El recuento de coliformes totales se realizó según las recomendaciones de la APHA (1992). Se tomó 1 ml de muestra y se sembró por homogeneización en masa añadiendo una doble capa de agar VRBA (Agar con Bilis, Rojo neutro y Cristal Violeta, Oxoid CM017) e incubando a 37° C durante 24 horas.

Las colonias típicas de coliformes aparecen de color rojo amoratado por la fermentación de la lactosa, con un diámetro de 1-2 mm y rodeadas de un halo rojizo por la precipitación de la bilis. A estas colonias se les realizaron las pruebas de confirmación descritas en el apartado II. 2. 2. 6.

II. 2. 2. 8. Enumeración de *Escherichia coli*

La determinación de *E. coli* se realizó siguiendo el procedimiento del número más probable (NMP), según la técnica descrita por De Man (1983).

Para la realización de esta técnica se utilizaron tres series de cinco tubos cada una, con 10 ml de caldo lactosado, verde brillante y bilis al 2 % (Oxoid CM31) y provistos de una campanita de Durham. Se sembró 1 ml de tres diluciones consecutivas y se incubó a 44° C en un baño termostático durante 24-48 horas.

La producción de gas se detectó por la presencia de una burbuja en la campanita de Durham. Con los tubos positivos se realizó la prueba del Indol, según el procedimiento descrito por la ICMSF (1983) que consiste en añadir unas gotas del reactivo de Kovacs (Merck nº 9293) a un cultivo del microorganismo problema en agua de peptona y mantener en agitación durante 10 minutos. Tras

este tiempo la aparición de color rojo oscuro en la superficie indica que la prueba es positiva.

La interpretación de los resultados se realizó según el criterio del test de Mckenzie *et al.*(1948), por el cual pertenecen al grupo de *E. coli* las colonias productoras de gas y que sean indol positivas. Los resultados se expresaron como el número más probable (NMP) de *E. coli* por Gramo de muestra.

II. 2. 2. 9. Presencia de *Salmonella* y *Shigella*

La presencia o ausencia de *Salmonella* y *Shigella* se determinó siguiendo el método descrito por la APHA (1976). En primer lugar se realizó un preenriquecimiento no selectivo, añadiendo 25 g de muestra a 225 ml de caldo lactosado (Oxoid CM137) e incubando a 37° C durante 24 horas. A continuación se realizó un enriquecimiento selectivo, sembrando 1 ml del cultivo anterior en 10 ml de caldo selenito (Oxoid CM395) con 0,4 % de biselenito sódico, y se incubó a 37° C durante 24 horas. Posteriormente se procedió al aislamiento selectivo partiendo del cultivo de enriquecimiento. Para la investigación de *Salmonella* se sembró en estría sobre la superficie de agar verde brillante (Oxoid CM329) y sobre agar sulfito de bismuto (Oxoid CM201) y para la investigación de *Shigella* se sembró además en agar XLD (Agar Xilosa, Lisina y Desoxicolato, Merck 5287). Todos estos cultivos se incubaron a 37° C durante 24-48 horas.

Tras el período de incubación se realizó la identificación presuntiva sembrando las colonias sospechosas crecidas en agar TSI (Triple Sugar Iron, Oxoid CM277) y en agar SIM (Sulfato-indol-motilidad, Oxoid CM435) incubándose en ambos casos a 37° C durante 24 horas.

Los resultados se expresaron como presencia o ausencia de *Salmonella-Shigella* en 25 g de muestra.

II. 2. 2. 10. Presencia de *Listeria monocytogenes*

Para la detección de *Listeria monocytogenes* se siguió el procedimiento descrito por Van Netten *et al.* (1989). Se realizó un enriquecimiento previo añadiendo a 25 g de muestra 225 ml de agua de peptona estéril e incubando a 30-37° C durante 24 horas. A partir de este cultivo se sembraron en superficie 0,1 ml sobre agar PALCAM (Merck 11755) con un suplemento selectivo para este medio (Merck 12122) y se incubó a 37° C durante 48 horas.

Las colonias de color verde grisáceo con un halo marrón-negro son típicas del crecimiento de *Listeria monocytógenes*. Los resultados se expresaron como presencia o ausencia de *L. monocytogenes* en 25 g de muestra.

II. 2. 2. 11. Enumeración de enterococos (grupo D de Lancefield)

Para el recuento de enterococos se siguió el método descrito por Mossel *et al.* (1978). La siembra se realizó en superficie extendiendo 0,1 ml de la dilución correspondiente sobre agar KAA (Kanamicina Aesculina Azida, Oxoid CM591) suplementado con 0,01 g de sulfato de Kanamicina (Oxoid SR92). Las placas se incubaron a 37° C durante 24-48 horas.

Las colonias típicas de enterococos presentan un halo oscuro a su alrededor debido a la hidrólisis de la aesculina. Las pruebas que se realizaron para la confirmación de estas colonias fueron las siguientes:

- 1.- **Tinción de Gram:** se realiza sobre cultivos frescos crecidos en agar PCA.
 - 2.- **Prueba de la catalasa:** las colonias seleccionadas se sembraron en caldo BHI y se añadió 1 ml de H₂O₂. La aparición de burbujas indica que la prueba es positiva.
-

3.- Crecimiento a diferentes temperaturas (10, 40 y 45° C) y concentraciones de sal (3,5 y 6,5 %): se realizaron siembras en caldo BHI incubando a diferentes temperaturas o adicionado de distintas concentraciones de sal.

II. 2. 2. 12. Enumeración de levaduras y mohos

El recuento de levaduras y mohos se realizó según recomendaciones de la APHA (1985). La siembra se realizó por homogeneización en masa, depositando 1 ml de la disolución correspondiente en placas de Petri y añadiendo 10-15 ml de agar PDA (Potato Dextrose Agar, Oxoid CM139) acidificado a pH 3,5 con ácido tartárico al 10 %. Las placas se incubaron a 26° C durante 96 horas.

II. 2. 2. 13. Cálculo de la velocidad de muerte microbiana

La velocidad de muerte se obtuvo mediante la ecuación de regresión del log ufc/g sobre el tiempo de maduración del salchichón y se expresó como el descenso medio del log ufc/g por semana de maduración (Fernández del Pozo *et al.*, 1988).

II. 2. 3. Métodos para análisis físico-químico

II. 2. 3. 1. Determinación de la humedad

La humedad se determinó según el procedimiento descrito en la técnica 964.22 de la AOAC (1990), que consiste en desecar la muestra en estufa a 105° C hasta obtener peso constante.

Procedimiento

En una cápsula metálica se pesaron 10 g de muestra y se desecaron en estufa a 105° C hasta peso constante (aproximadamente 24 horas). El cálculo del porcentaje de humedad se realizó por diferencia de pesadas.

II. 2. 3. 2. Determinación del pH

El pH se determinó usando un pH-metro digital Beckman 3500 con electrodo para muestras sólidas según se describe en la Norma ISO R- 2917 (1974), para cada muestra se realizaron tres determinaciones.

II. 2. 3. 3. Determinación de las cenizas

El contenido en cenizas se determinó por incineración en horno de mufla a temperatura no superior a 550° C, según la Norma Internacional ISO R-936 (1973).

Procedimiento

En una cápsula de porcelana, previamente desecada sobre silicagel y tarada, se pesaron 5 g de muestra y se colocó sobre una placa calefactora hasta la carbonización de la muestra, evitando en lo posible las proyecciones. Posteriormente se incineró en horno de mufla hasta obtener unas cenizas blancas o ligeramente grises, que se introdujeron en un desecador hasta la realización de la pesada.

II. 2. 3. 4. Determinación de la actividad de agua (a_w)

La medición de la a_w se realizó con un higrómetro de punto de rocío CX-1, que realiza con precisión de 0,003 unidades, medidas comprendidas entre 0,03 y 1,00 unidades de a_w .

Procedimiento

La muestra previamente homogeneizada se colocó en una cápsula de plástico que se tapó hasta que alcanzó una temperatura próxima a la del higrómetro (temperatura ambiente). Posteriormente se introdujo la cápsula

destapada en la cámara de medición del higrómetro. La medida digital de la a_w y la temperatura se produce en 2 ó 3 minutos, aproximadamente.

II. 2. 3. 5. Control de mermas

El control de mermas se realizó efectuando pesadas periódicas a dos piezas de salchichones de cada lote que se reservaron para este fin. Las pesadas se realizaron coincidiendo con los días de control.

Los resultados se expresaron como porcentaje de mermas referidos al peso inicial de cada pieza de salchichón.

II. 2. 3. 6. Determinación de cloruros

Los cloruros se extrajeron de la muestra mediante una solución alcohólica caliente y posteriormente se cuantificaron según el método oficial de análisis de carne y productos cárnicos de Carpentier-Vohlard (Presidencia de Gobierno, 1979).

Reactivos

- Solución titulada de nitrato de plata 0,1 N (se tituló con ClNa 0,1 N).
- Solución de ácido nítrico concentrado de densidad 1,63 g/l.
- Solución acuosa de sulfato férrico amónico (alumbre férrico) al 4 %.
- Nitrobenceno.
- Solución titulada de sulfocianuro potásico 0,1 N (se tituló con una solución estándar de nitrato de plata 0,1 N).
- Solución de alcohol etílico al 40 %.
- Reactivo de Carrez:
 - Solución acuosa de ferrocianuro potásico al 15 %.
 - Solución acuosa de acetato de cinc al 30 %.

Procedimiento

Preparación de extracto

Se pesaron aproximadamente 10 g de muestra picada y se añadieron 150 ml de alcohol etílico al 40 %. Se calentó a ebullición suave durante 1 hora en agitación. Se dejó enfriar y se añadieron, consecutivamente, 5 ml de cada una de las soluciones del reactivo de Carrez. Después de 10 minutos de reposo se centrifugó durante 5 minutos a 2000 rpm. Se filtró y se evaporó el líquido hasta 100 ml aproximadamente para eliminar el alcohol etílico. Finalmente se dejó enfriar y se completó con agua destilada hasta un volumen de 200 ml.

Cuantificación de los cloruros

A 10 ml del extracto anterior se le añadieron 10 ml exactamente medidos de nitrato de plata 0,1 N, 1 ml de ácido nítrico, 1 ml de alumbre férrico y 50 ml de agua destilada. Se dejó reposar durante 10 minutos en la oscuridad y se añadió 1 ml de nitrobenzeno. Finalmente se valoró el exceso de nitrato de plata con la solución de sulfocianuro 0,1 N.

II. 2. 3. 7. Determinación de nitritos

La determinación de nitritos se realizó según el método oficial de análisis de carne y productos cárnicos (Presidencia de Gobierno, 1979). Partiendo del mismo extracto alcohólico que se utilizó para la determinación de cloruros se determina el contenido de nitritos mediante una reacción colorimétrica.

Reactivos

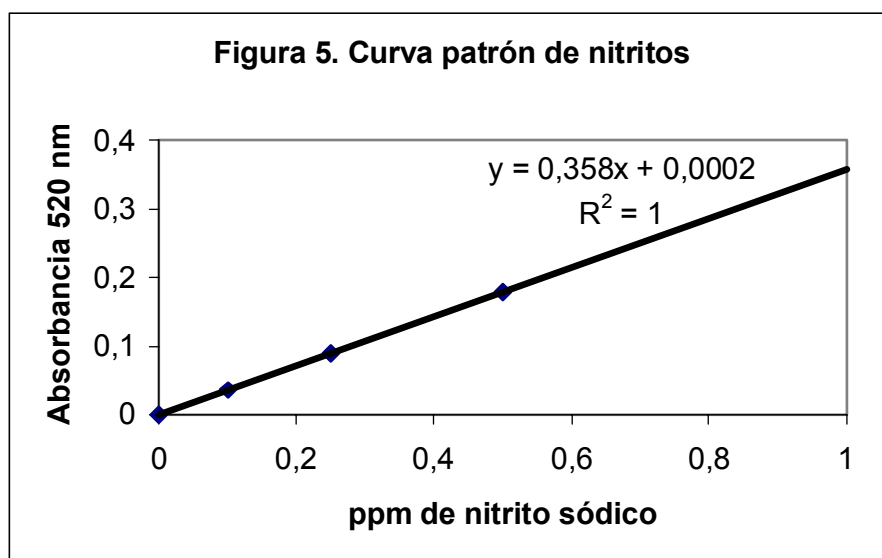
- Solución patrón de nitrito sódico (5 µg de nitrito sódico por ml).
 - Reactivo colorimétrico:
 - Solución I. Se disolvieron calentando 6 g de ácido sulfanílico en 200 ml de ácido acético glacial y 400 ml de agua destilada. Posteriormente
-

se añadieron 200 ml de una solución de cloruro sódico (100 g/l) y se diluyó con agua hasta 1 l.

- Solución II. Se disolvieron calentando 0,3 g de cloruro de α -naftilamina en 100 ml de agua destilada. Se añadieron 200 ml de ácido acético glacial y se diluyó hasta 1 l con agua destilada.

Procedimiento

Del extracto obtenido para la determinación de cloruros se tomaron 10 ml y se adicionaron 5 ml de cada solución del reactivo colorimétrico. Se dejaron reposar en oscuridad 20 minutos y se midió la intensidad de color a 520 nm. Los valores obtenidos se refirieron a un recta patrón preparada con distintas concentraciones de nitrito sódico a partir de la solución patrón (Figura 5).



II. 2. 3. 8. Determinación del nitrógeno no proteico

Se realizó siguiendo el método descrito por Johnson-Nessler (1941), previa precipitación de las proteínas de la muestra con ácido tricloroacético.

Reactivos

- Acido tricloroacético al 11,5 %
- Acido sulfúrico con selenio. Se disolvieron 400 mg de selenio en 1 l de ácido sulfúrico y se calentó hasta su clarificación.
- Solución de hidróxido sódico 4 N
- Reactivo de Nessler. Para su preparación se disolvieron 4 g de IK y 4 g de I₂Hg en 300 ml de agua destilada. A continuación se añadieron 1,75 g de goma arábica que se solubilizó en ebullición y se completó hasta un volumen final de 1 l con agua destilada.
- Solución estándar de sulfato amónico (SO₄(NH₄)₂) con una concentración de 8 µg de nitrógeno por ml.

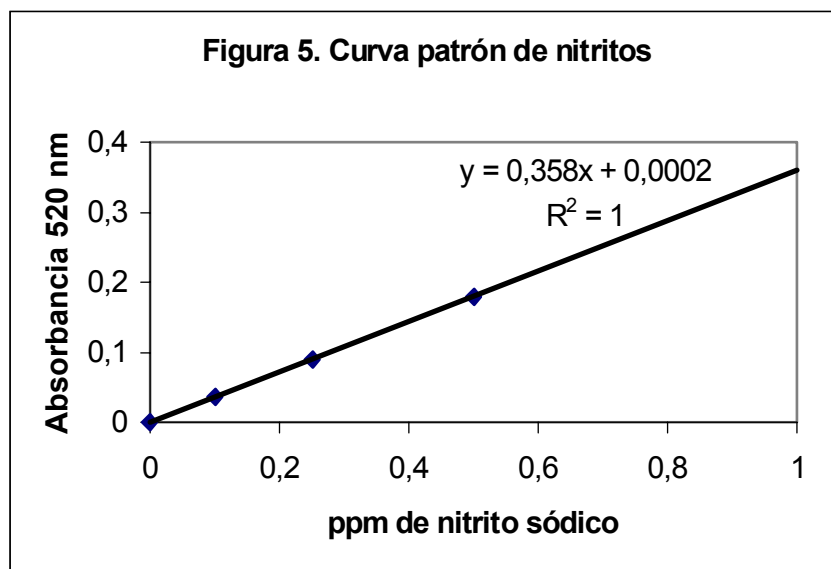
Procedimiento

Se tomaron muestras de 2 g a las que se le adicionaron 38 ml de ácido tricloroacético al 11,5 % y se homogeneizaron perfectamente. Pasados 30 minutos se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos y se tomaron 2ml del sobrenadante que se oxidaron, con 3 ml de ácido sulfúrico con selenio en matraces de digestión Kjeldahl, hasta clarificación total. Tras la digestión el líquido incoloro se diluyó hasta un volumen de 100 ml. Se tomaron alícuotas de 2 ml a las que se les añadió 3 ml de agua destilada, 3 ml de NaOH 4 N y 2 ml de reactivo de Nessler. El color desarrollado se evaluó colorimétricamente a 490 nm, refiriendo las lecturas a una recta patrón elaborada con una solución de sulfato amónico (Figura 6).

II. 2. 3. 9. Determinación de proteínas

Para la determinación de las proteínas se utilizó el método 981.10 de la AOAC (1990) basado en el Método de Kjeldahl, en el cual mediante una combustión líquida el N se convierte en sulfato amónico y posteriormente en

amoníaco. El amoníaco se destila y se titula después con ácido. El contenido en proteínas se estima multiplicando el contenido de nitrógeno por 6,25.



Reactivos

- Acido sulfúrico 96 % de riqueza y 1,84 de densidad
- Catalizador Kjeldahl Cu-Se.
- Acido clorhídrico 0,1 N
- Solución de indicador rojo de metilo al 0,5 % en etanol
- NaOH al 35 %
- NaOH 0,1 N

Procedimiento

Se depositaron 2 g de muestra en matraces de digestión junto con 15 ml de ácido sulfúrico y 2 pastillas de catalizador. Tras la digestión se enfriaron los matraces y se les añadió 75 ml de agua destilada para disolver el residuo remanente. A continuación se colocó el matraz de digestión en la unidad de destilación y se le añadió NaOH al 35 % en cantidad suficiente para alcalinizar el

medio. En un matraz erlenmeyer, al que se habían añadido 50 ml de ácido clorhídrico y unas gotas de indicador, se recogieron 150 ml de destilado que se tituló con NaOH 0,1 N para valorar el exceso de ácido.

II. 2. 3. 10. Determinación de grasa

Se determinó según el Método Soxhlet que se basa en la capacidad que presenta la grasa para disolverse en solventes orgánicos (Método 960.39 de la AOAC, 1990).

Reactivos

- Eter de petróleo de punto de ebullición 50-70° C

Procedimiento

Se pesaron 10 g de muestra en cápsulas metálicas y se desecaron a 105° C durante 18 horas, el residuo pesado se llevó a un cartucho de papel de filtro Whatman nº1 y se introdujo en la cámara de extracción del aparato Soxhlet. Se pesaron con precisión los matraces colectores, previamente desecados en estufa de aire caliente. A continuación se vertió el éter de petróleo en la cámara de extracción dejando sifonar el matraz colector una vez y llenando hasta la mitad. Se comenzó la extracción a una velocidad de 4-6 gotas por minuto durante 6 horas. Una vez extraída la grasa, se pesó el matraz colector y se calculó el contenido en grasa de la muestra sobre la base del producto húmedo y de materia seca.

II. 2. 3. 11. Determinación del índice de peróxidos

Para la determinación del índice de peróxidos se siguió el método descrito por la UNE 55-023-73 (1973), habiendo extraído previamente la grasa empleando el método de Folch (1957).

Reactivos

- Cloroformo.
- Acido acético glacial puro.
- Solución acuosa saturada de ioduro potásico.
- Sulfato sódico anhidro.
- Soluciones valoradas de tiosulfato sódico 0,002 N.
- Solución indicadora de almidón al 1 % en agua destilada.

Procedimiento

Extracción de la grasa

Se pesaron 20 g de muestra y se añadieron 20 ml de cloroformo-metanol en proporción 2:1, homogeneizando la mezcla con una batidora durante 1 minuto. Posteriormente, se añadió agua destilada en igual cantidad al peso de la muestra inicial y se homogenizó de nuevo. El homogenizado resultante se centrifugó durante 5 minutos a 5000 rpm y se filtró sobre un embudo de decantación con el fin de separar las dos fases. Se recogió la fase orgánica filtrando a través de sulfato sódico anhidro para suprimir los restos de agua. El disolvente se evaporó en un rotavapor a una temperatura de 45° C.

Investigación de peróxidos

Se pesaron aproximadamente 2 g de grasa y se disolvieron en 3 ml de cloroformo. A continuación, se añadieron 15 ml de ácido acético glacial y 1 ml de disolución saturada de ioduro potásico. Se agitó durante 1 minuto y se conservó en la oscuridad durante 5. Transcurrido este tiempo se añadieron 75 ml de agua destilada, agitando vigorosamente para favorecer su combinación. El yodo liberado en la reacción, que se produce entre el oxígeno ligado en forma de peróxido y el ioduro, se valora con tiosulfato sódico 0,002 N. Se utilizó como indicador almidón al 1 %.

Los resultados se expresaron como miliequivalentes de oxígeno por kg de materia grasa.

II. 2. 3. 12. Determinación del índice del TBA (Acido Tiobarbitúrico)

La formación de malonaldehído en alimentos está asociada al enranciamiento oxidativo de los mismos. El índice del TBA se basa en una reacción colorimétrica que mide el pigmento rojo formado cuando reacciona el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) con el malonaldehído. Esta determinación se realizó siguiendo el método descrito por Tarladgis (1964).

Reactivos

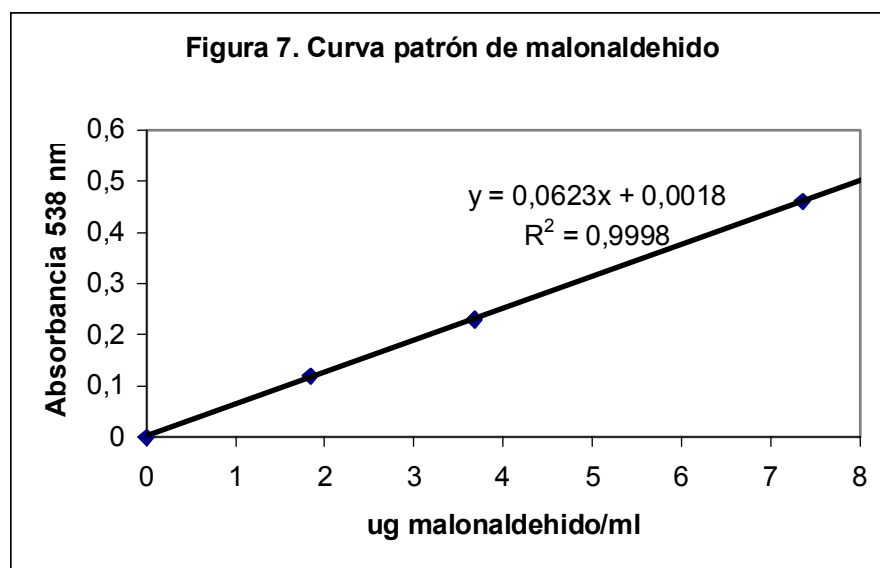
- Solución de TBA. Se preparó mezclando 0,2883g de ácido tiobarbitúrico en 100 ml de ácido acético glacial al 90 %.
- Solución de malonaldehído. (1,84 g de malonaldehído/ml).
- Acido clorhídrico 4 N
- Piedra pómez

Procedimiento

Se preparó un macerado con 5 g de muestra y 50 ml de agua destilada y se homogeneizó perfectamente. Esta solución se llevó a un pH de 1,5 aproximadamente con 2,5 ml de HCl 4 N y se añadieron varios gránulos de piedra pómez. A continuación se sometió a destilación y, 10 minutos después de que cayese la primera gota, se recogieron 50 ml de destilado. Este destilado se almacenó en refrigeración (4° C) durante 18 horas. Tras este tiempo se tomaron 5 ml de destilado y se añadieron 5 ml de la solución de TBA, recientemente preparada. Posteriormente se llevó a un baño de agua a 100° C durante 35 minutos, tras lo cual se enfrió en un baño de hielo y se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 538 nm. Los valores obtenidos se refirieron a un recta patrón

preparada con distintas concentraciones de malonaldehído a partir de la solución patrón (Figura 7).

Los resultados se expresaron como mg de malonaldehído por kg de muestra.



II. 2. 3. 13. Determinación de la acidez titulable (expresado como porcentaje de ácido láctico)

Para determinar la acidez titulable se siguió la técnica 16.247 de la A.O.A.C.(1990).

Reactivos

- Solución de NaOH 0,1 N
- Solución alcohólica de fenolftaleína al 0,1 %

Procedimiento

Se pesaron 10 g de muestra y se homogeneizaron perfectamente con 105 ml de agua destilada calentada a 40° C. Se agitó vigorosamente y se filtró. Se tomaron 25 ml de este filtrado (representan 2,5 g de muestra) y se añadieron unas gotas del indicador de fenolftaleína; a continuación se tituló con una solución de NaOH 0,1 N. El resultado se expresó como ácido láctico, sabiendo que 1 ml de NaOH 0,1 N equivale a 0,0090 g de ácido láctico.

II. 2. 4. Evaluación de los atributos sensoriales

La estimación subjetiva de cada uno de los atributos sensoriales evaluados a los 30 días de maduración fue realizada por 20 catadores seleccionados entre personal, con cierta experiencia, vinculado al Departamento y a la empresa. La evaluación de los parámetros sensoriales se realizó en tres sesiones, coincidiendo con el final de la maduración de las tres partidas de salchichones en los períodos de marzo de 1997, diciembre de 1997 y mayo de 1998.

Las sesiones se llevaron a cabo en la sala de cata del departamento con 10 puestos individuales y provistos de iluminación adecuada y en la sala de catas de la empresa.

Las muestras se presentaron a los catadores en lonchas de aproximadamente 0,5 cm de grosor, servidas en una bandeja de plástico y junto a la ficha de cata que se presenta a continuación y que recoge los 14 atributos sensoriales que se consideraron de mayor interés: relacionados con el aspecto, olor, sabor, textura y aceptabilidad general, correspondiendo a cada uno de ellos una escala horizontal de 10 puntos.

ASPECTO										
Grado de picado										
Color										
Aspecto visual al corte										
Acortezamiento										
Facilidad de separación de la tripa										
OLOR										
Intensidad del olor										
Presencia de olores extraños										
SABOR										
Acidez										
Picante										
Presencia de sabores extraños										
Intensidad del sabor										
TEXTURA										
Dureza										
Jugosidad										
Aceptabilidad General										

II. 2. 5. Tratamiento estadístico de los resultados

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el paquete estadístico “Statistica for Windows” de Statsoft, Inc. (1997). Se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA), de dos factores con repetición. Un diseño factorial con varias medidas por casilla, que se ajusta al siguiente modelo:

$$X_{ijk} = \mu + P_i + T_j + P_{tj} + \varepsilon_{ijk}$$

donde μ es la medida general, P_i es el efecto del tipo de cultivo adicionado al salchichón, T_j es el efecto del tiempo de maduración, PT_j el efecto de la

interacción entre ambos y ε_{ijk} el efecto del valor individual k (parámetro determinado en salchichón) dentro de la combinación ij , es decir las posibles causas de error no controlables. Una vez determinada la existencia de diferencias significativas entre las diferentes muestras se aplicó la prueba de Tukey, para realizar una comparación múltiple de medias, sólo en los casos en los que el Anova fue significativo.

Una vez realizados los análisis de diferencias significativas y establecidas las correlaciones entre los mismos, se realizaron diversos análisis multidimensionales, como el análisis de componentes principales, análisis factorial y análisis de “cluster”.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III. RESULTADOS Y DISCUSION

III. 1. COMPOSICION QUIMICA BRUTA

III. 1. 1. Evolución de la humedad

En la Tabla 13 se muestran los valores medios de humedad y desviaciones típicas que presentaron los diferentes lotes de salchichones analizados, expresados como g humedad/100 g muestra. En la Figura 8 se representa la evolución del contenido de humedad a lo largo del proceso de maduración.

Como se puede observar se produce un descenso paulatino de la humedad desde valores iniciales comprendidos entre 59,79 % (lote C) y 63,89 % (lote B) hasta valores finales que oscilaron entre 36,93 (lote A) y 40,63 (lote C). Todos los embutidos analizados, excepto los inoculados con el bioconservador tipo 2 (lote C), cumplen la Norma de Calidad para el salchichón (Presidencia del Gobierno, 1980) que estima un contenido acuoso máximo del 40 % para las categorías extra, primera y segunda. Las muestras de embutidos incluidas en el lote C superaron ligeramente el porcentaje máximo de humedad permitido.

La reducción del contenido de humedad comenzó durante el estufaje y se hizo más intenso a partir de la primera semana de maduración, donde se observaron las mayores pérdidas. Estas diferencias durante la evolución del proceso no fueron significativas entre las etapas de amasado y estufaje ($p > 0,05$), aunque sí se establecieron diferencias estadísticamente significativas entre el resto de etapas ($p < 0,001$).

En cuanto al tratamiento, no se observaron diferencias significativas entre lotes ($p > 0,05$), lo cual indica que el tipo de aditivo láctico añadido no influye en la modificación del contenido de humedad.

Tabla 13. Porcentaje de humedad (media \pm desviación típica) de los distintos lotes de salchichones analizados en las diferentes etapas del proceso de elaboración (expresado en g humedad/100 g salchichón).

Lotes	Amasado	Estufaje	Secado	Secado	Secado	Secado
			1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
A-Control	61,17 \pm 2,32	61,13 \pm 0,75	56,11 \pm 3,02	50,78 \pm 2,89	43,61 \pm 2,73	36,93 \pm 1,21
B-Bioconser. 1	63,89 \pm 2,12	61,39 \pm 1,14	57,13 \pm 1,80	52,54 \pm 2,35	45,16 \pm 1,21	39,28 \pm 1,03
C-Bioconser. 2	59,79 \pm 2,82	60,40 \pm 1,30	59,12 \pm 1,04	54,01 \pm 1,03	47,81 \pm 0,69	40,63 \pm 0,97
D-Cultivo 1	61,37 \pm 0,86	61,91 \pm 0,76	55,80 \pm 1,97	49,71 \pm 2,01	45,35 \pm 0,51	38,06 \pm 0,73
E-Cultivo 2	61,26 \pm 1,39	61,70 \pm 0,71	57,10 \pm 2,46	50,25 \pm 2,58	44,22 \pm 2,03	38,93 \pm 1,39

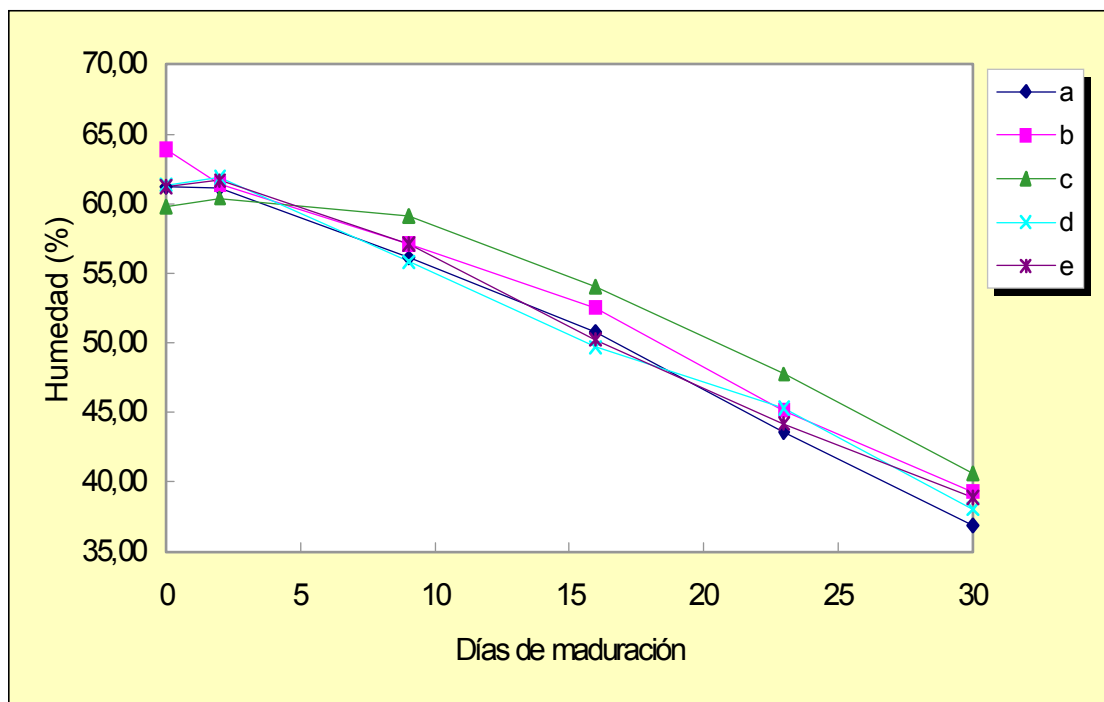


Figura 8. Evolución del porcentaje de humedad de los distintos lotes de salchichones durante la maduración.

Los valores determinados en este trabajo son ligeramente superiores a los observados por otros autores en embutidos españoles sometidos a un proceso de elaboración y maduración similares. Gorospe *et al.* (1989) comprobaron que salchichones de calidad extra con un porcentaje de humedad inicial de $56,5 \pm 0,19$, al final de la maduración se reducía a $32,7 \pm 0,18$. En otros trabajos el porcentaje final es incluso inferior al 30 % (Astiasarán *et al.*, 1990b; Ibáñez *et al.*, 1996). No obstante los valores obtenidos coinciden con los observados por Coppola *et al.* (1995) que partiendo de embutidos con un contenido acuoso inicial del 61,8 % y con un patrón de desecación similar, obtuvieron a los 30 días de maduración embutidos con un 37,2 % de agua. Incluso, son ligeramente inferiores a los observados por Diaferia *et al.* (1998) para salchichones italianos comparables, que obtuvieron al final de la maduración un porcentaje de humedad del 43,77 %. Asimismo, Beriain *et al.* (1993) determinaron valores finales que superaron el 40 %.

La humedad es un parámetro que, entre otros factores, está influenciado por el grado de picado de la masa cárnica y ésta puede ser la causa de la diferencia en el contenido final de humedad de nuestros embutidos con respecto a los de otros trabajos similares. Los valores más bajos de humedad recogidos en la bibliografía corresponden a productos que fueron picados con una placa de 3 mm (Astiasarán *et al.*, 1990a; Chasco *et al.*, 1992a; Chasco *et al.*, 1993) mientras que nuestros embutidos fueron picados en placa de 8 mm. El grado de picado más grueso favorece procesos de desecación más lentos, esto ya fue observado por Keller *et al.* (1974) que obtuvieron mayores pérdidas en los embutidos con picado más fino, que en los de picado grueso, durante las últimas fases del período de maduración. En trabajos más recientes, también se ha comprobado que en chorizos de picado grueso los valores finales de humedad superaban el 45 % (Beriain *et al.*, 1989; Beriain *et al.*, 1990; Astiasarán *et al.*, 1990a; Cid *et al.*, 1992).

La disminución del pH, fundamentalmente en la etapa de estufaje, también afecta al proceso de desecación, ya que el pH ácido provoca la desnaturalización de las proteínas sarcoplásmicas que precipitan sobre las miofibrilares provocando la reducción de su capacidad de retención de agua (Bello *et al.*, 1974). En este caso, se ha comprobado que los embutidos que mostraron al final de la maduración mayores contenidos de humedad (lote C) coinciden con los que presentaron los valores de pH más altos.

Un aspecto muy relacionado con la disminución de la humedad en el proceso de maduración de los embutidos es la pérdida de peso ó merma que se origina por la desecación del producto. En la Tabla 14 se presentan los valores medios y la desviación típica del porcentaje de pérdida de peso de los salchichones analizados, y en la Figura 9 se representa gráficamente la evolución de estos valores a lo largo de la maduración.

Tras el procesado las piezas analizadas superaron en todos los casos el 30 % de pérdidas. Esta pérdida de peso se realizó de forma gradual a partir del estufaje, momento en el que se inició la fase de secado. Durante el estufaje se produjo una ligera pérdida de peso aunque no llegó a superar el 5 % de la merma total. Tras la primera semana de maduración los embutidos habían sufrido una pérdida de peso superior al 13 %, excepto los inoculados con el cultivo iniciador aislado, que sólo perdieron el 9,65 %. Estas mermas suponen un 29 % de la merma total para los embutidos del lote A y del 35 % para el resto y constituyen la disminución de peso más importante que se efectuó durante todo el proceso. En la segunda semana, la dinámica de pérdida de peso fue similar alcanzándose valores que oscilaron entre el 18 % y el 23 % de mermas. En la tercera y cuarta semana de secado las diferencias entre las mermas de los distintos lotes de embutidos se atenúan consiguiéndose al final un porcentaje de pérdida de peso total que osciló entre el 32,65 % (lote C) y el 33,77 % (lote E).

Tabla 14. Porcentaje de pérdida de peso (media \pm desviación típica) de los distintos lotes de salchichones analizados en las diferentes etapas del proceso de elaboración.

Lotes	Amasado	Estufaje	Secado	Secado	Secado	Secado
			1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
A-Control	0,00	1,95 \pm 2,48	13,62 \pm 3,61	23,05 \pm 3,68	28,44 \pm 2,32	33,31 \pm 1,78
B-Bioconser. 1	0,00	1,45 \pm 1,32	13,16 \pm 1,36	21,86 \pm 2,99	27,98 \pm 1,54	32,90 \pm 1,28
C-Bioconser. 2	0,00	1,85 \pm 1,74	13,13 \pm 2,62	21,83 \pm 2,89	27,65 \pm 1,43	32,65 \pm 1,18
D-Cultivo 1	0,00	1,52 \pm 1,47	13,16 \pm 2,74	22,26 \pm 2,10	28,13 \pm 0,73	32,79 \pm 0,69
E-Cultivo 2	0,00	1,93 \pm 1,93	13,99 \pm 3,24	23,43 \pm 2,24	28,97 \pm 1,12	33,77 \pm 0,91

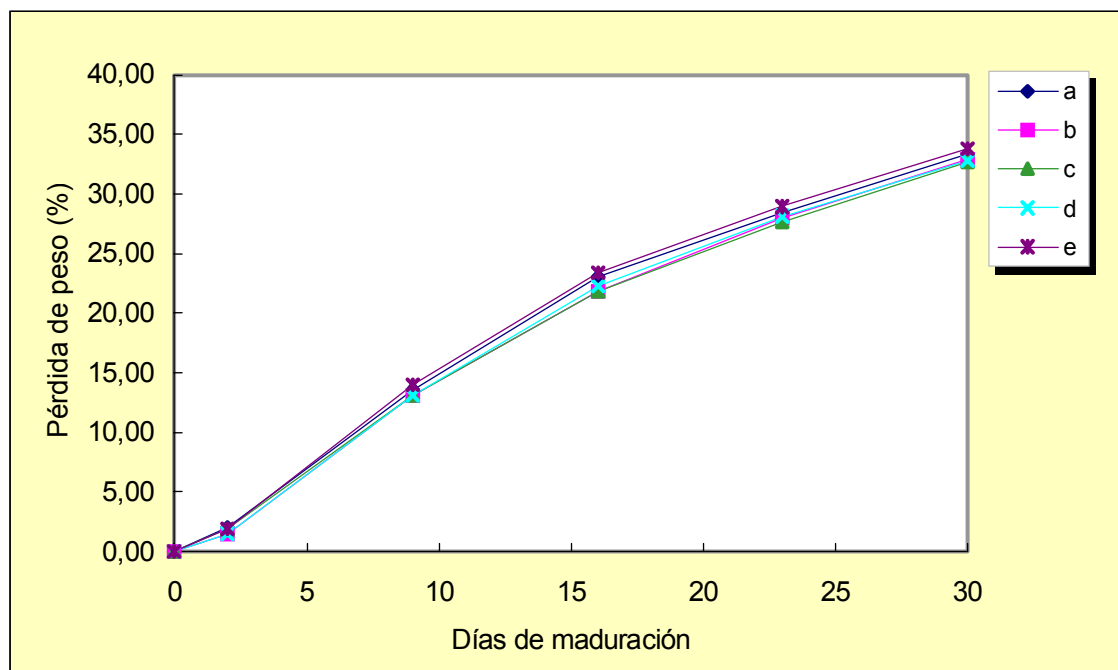


Figura 9. Evolución de las pérdidas de peso experimentadas por los distintos lotes salchichones durante la maduración.

Coppola *et al.* (1995) determinaron durante los primeros 7 días de maduración el 50 % de la pérdida de peso total, mientras que en nuestros embutidos a los 9 días sólo se había determinado alrededor del 40 % de la merma total.

Como se puede apreciar en la Figura 9, la pérdida de peso incrementó a medida que avanzaba la maduración y las diferencias observadas entre las distintas etapas del proceso fueron estadísticamente significativas ($p < 0,001$). En cuanto al tratamiento, las diferencias estimadas no fueron significativas ($p > 0,05$), lo cual indica que el tipo de cultivo añadido no afectó al proceso de desecación del producto.

Como se ha mencionado, la mayor pérdida de peso se evidenció tras la primera semana de desecación donde se determinó el 34 % de la merma total (valor medio de los 5 lotes), sin embargo no coincide con el momento en el que se observaron las mayores pérdidas de humedad, que se produjeron en la última semana de maduración. Esto puede deberse a que la tripa utilizada en el proceso de embutido se mantiene en remojo previamente y contiene una humedad que es cuantificada en la medida de las mermas pero no en la medida del contenido acuoso, ya que este método requiere la retirada previa de la tripa. Esta humedad exterior se elimina rápidamente cuando los embutidos son trasladados a la cámara de maduración y constituye una pérdida de peso adicional por la evaporación de este agua, aunque no supone una disminución proporcional del contenido acuoso de la muestra. No obstante existe una correlación negativa y altamente significativa entre el contenido de humedad y las pérdidas de peso ($r = - 0,9436$; $p < 0,001$) que se corresponde con el hecho de que la pérdida de peso se debe a la eliminación del agua del producto durante la maduración.

A pesar de que nuestros embutidos cumplen la Norma de Calidad que establece la Legislación Alimentaria Española en lo que se refiere al contenido

de humedad, quizás hubiera sido conveniente prolongar el período de desecación una semana más con el fin de conseguir un producto más estable, aunque desde el punto de vista industrial esto no es beneficioso ya que las mermas hacen disminuir el peso del producto y por tanto su rendimiento económico.

III. 1. 2. Porcentaje de proteínas

En la Tabla 15 se exponen los porcentajes medios de proteínas y las desviaciones típicas de los salchichones analizados, y en la Figura 10 se representa su evolución a lo largo de la maduración. Estos valores están expresados como g proteína/100 g sustancia seca.

Como puede observarse en la Figura 10, el porcentaje de proteínas se mantuvo prácticamente constante durante todo el proceso, con un rango de oscilación comprendido entre el 44,59 % y el 49,42 % y un valor medio de 46,57 % para todas las muestras analizadas (Tabla 15). No se apreciaron diferencias significativas ($p > 0,05$) ni entre lotes ni en las distintas etapas de la maduración y todos los embutidos estudiados rebasaron el contenido proteico exigido por la Legislación Alimentaria Española (Presidencia del Gobierno, 1980) que estima una cantidad mínima de proteínas del 30 % (expresado sobre extracto seco) para los salchichones de categoría extra.

Los valores obtenidos en este estudio, cercanos al 45 % (g proteína/100 g materia seca), son más elevados que los obtenidos por otros autores para embutidos de características similares, en torno al 30 % (Astiasarán *et al.*, 1990b; Cid *et al.*, 1992; Chasco *et al.*, 1992a, 1993; Beriain *et al.*, 1993; Kostenko *et al.*, 1998). Sin embargo, se aproximan a los determinados por Córdoba y Fernández-Salguero (1988) para salchichones de categoría extra, donde obtienen un valor medio de 38,25 %.

Tabla 15. Porcentaje de proteínas (media \pm desviación típica) de los distintos lotes de salchichones analizados en las diferentes etapas del proceso de elaboración (expresado en g proteína/100 g sustancia seca).

Lotes	Amasado	Estufaje	Secado			
			1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
A-Control	46,75 \pm 4,37	49,42 \pm 0,44	47,95 \pm 3,03	46,52 \pm 1,18	45,27 \pm 1,97	45,10 \pm 1,34
B-Bioconser. 1	48,32 \pm 3,28	47,14 \pm 1,98	47,60 \pm 2,85	47,49 \pm 2,17	44,92 \pm 2,51	44,66 \pm 2,96
C-Bioconser. 2	44,64 \pm 3,39	47,32 \pm 2,06	49,36 \pm 2,62	47,89 \pm 1,66	47,03 \pm 1,64	44,59 \pm 1,90
D-Cultivo 1	47,27 \pm 2,40	47,53 \pm 2,76	47,05 \pm 1,95	45,36 \pm 1,68	46,04 \pm 2,04	44,75 \pm 1,73
E-Cultivo 2	46,55 \pm 3,28	47,21 \pm 0,83	47,04 \pm 1,64	45,24 \pm 2,06	44,68 \pm 2,02	46,30 \pm 3,05

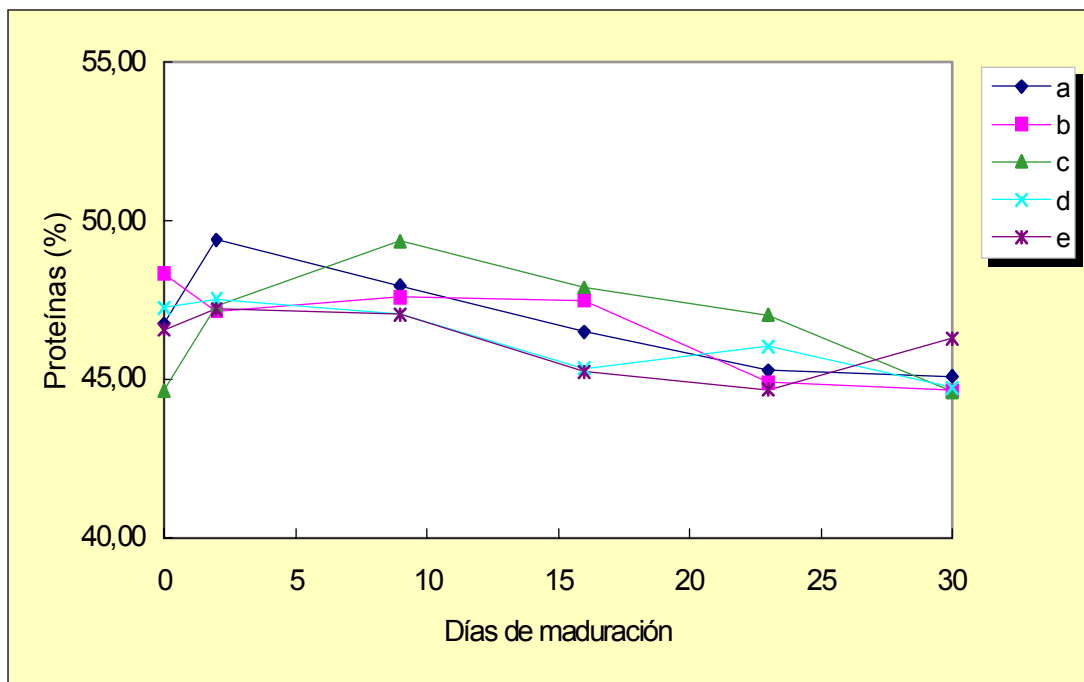


Figura 10. Evolución del porcentaje de proteínas de los distintos lotes de salchichones durante la maduración.

III. 1. 3. Porcentaje de grasa

Los valores medios de grasa (expresados como g grasa/100 g sustancia seca) y las correspondientes desviaciones típicas de los salchichones analizados se muestran en la Tabla 16; y en la Figura 11 se representa la evolución de este porcentaje de grasa a lo largo de la maduración de los embutidos.

Como puede observarse el porcentaje de grasa se mantiene prácticamente constante durante todo el proceso con valores que oscilan entre 35,63-41,49 % y con un valor medio de 38,12 %. Todos los embutidos analizados cumplen la Norma de calidad para salchichón (Presidencia del Gobierno, 1980) que establece un porcentaje máximo de grasa del 57 % para salchichones de categoría extra.

No se apreciaron diferencias significativas ni entre las distintas etapas de maduración ni entre los lotes de salchichones inoculados con los diferentes aditivos lácticos. Los resultados conseguidos son ligeramente inferiores a los obtenidos por otros autores para embutidos de características similares (Córdoba y Fernández-Salguero, 1988; Beriain *et al.*, 1989, 1993; Cid *et al.*, 1992; Chasco *et al.*, 1992a, 1993) aunque son similares a los mostrados por Coppola *et al.* (1995) para salami. Estas diferencias son debidas a las variaciones en el contenido de humedad del producto, ya que a mayor porcentaje de humedad menor contenido en grasa, y en este caso los valores de humedad obtenidos en este trabajo son superiores a los observados por los citados autores.

III. 1. 4. Porcentaje de cenizas

En la Tabla 17 se exponen los valores medios y las desviaciones típicas del porcentaje de cenizas expresado como g cenizas/100 g materia seca. Del mismo modo, en la Figura 12 se representa la evolución de este porcentaje a lo largo de la maduración.

Como puede observarse el porcentaje de cenizas a lo largo de la maduración permanece prácticamente constante, no apreciándose diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las distintas etapas del proceso. El rango entre el que oscila el porcentaje de cenizas está comprendido entre 7,81 % y 8,96 %, con un valor medio de 8,36 %. Estos datos coinciden con los observados por Beriain *et al.* (1993) que obtuvieron un rango de valores comprendido entre 8,0 y 8,7 % en embutidos de características similares, y con los encontrados por Coppola *et al.* (1995) para salami. No obstante, Córdoba y Fernández-Salguero (1988) en un estudio comparativo sobre salchichones obtuvieron porcentajes de cenizas de 11,16; 10,42; 8,91 y 8,76 %, para las categorías extra, primera, segunda y tercera, respectivamente.

III. 1. 5. Cantidad de ácido láctico

En la Tabla 18 se representan los valores medios y las desviaciones típicas de la cantidad de ácido láctico (expresado como mmoles ácido láctico / 100 g materia seca) determinada en los distintos lotes de embutidos analizados. La evolución de estos valores a lo largo de la maduración se representa en la Figura 13.

Durante la fase de estufaje la cantidad de ácido láctico inicial se vió incrementada, aproximadamente, en 1,5 veces, aunque este incremento fue más acusado en los salchichones inoculados con el cultivo iniciador 1 (lote D) que casi duplicaron la concentración inicial (Tabla 18).

En las dos semanas primeras semanas de maduración la concentración de ácido láctico siguió elevándose ligeramente alcanzándose los valores máximos para todos los lotes, que oscilaron entre 5,08 mmoles para los embutidos inoculados con el cultivo iniciador aislado (lote B) y 6,44 mmoles para los inoculados con el cultivo comercial 1. Durante las dos últimas semanas del proceso la cantidad de ácido láctico disminuyó ligeramente, aunque este

Tabla 16. Porcentaje de grasa (media±desviación típica) de los distintos lotes de salchichones analizados en las diferentes etapas del proceso de elaboración (expresado en g grasa/100 g sustancia seca).

Lotes	Amasado	Estufaje	Secado			
			1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
A-Control	38,43±2,44	39,63±2,10	39,67±2,91	38,15±1,49	38,47±2,53	37,74±2,58
B-Bioconser. 1	38,16±1,56	37,54±1,78	41,49±1,67	37,47±1,60	38,11±2,84	36,72±2,36
C-Bioconser. 2	38,78±2,11	35,63±3,09	38,53±3,61	38,92±4,08	37,50±2,35	37,30±2,06
D-Cultivo 1	37,32±1,49	38,12±1,34	38,98±1,76	38,67±1,61	37,08±2,34	35,05±2,05
E-Cultivo 2	36,61±1,43	40,78±2,72	38,04±3,54	37,25±0,90	38,79±2,03	38,71±1,57

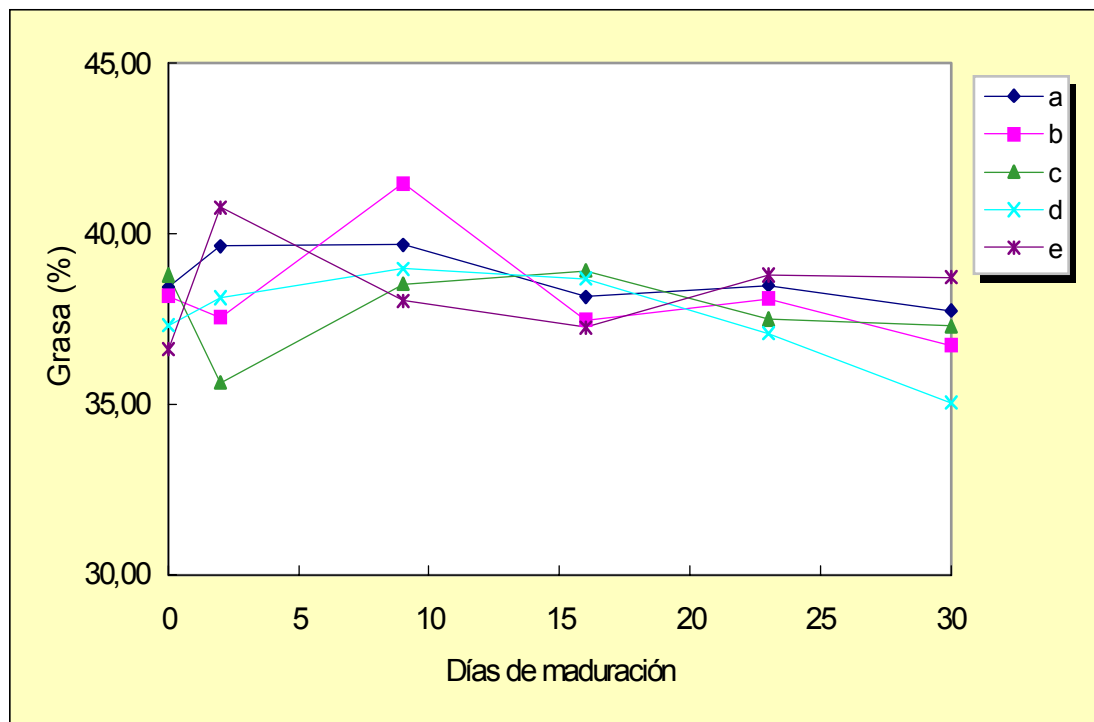


Figura 11. Evolución del porcentaje de grasa de los distintos lotes de salchichones durante la maduración.

Tabla 17. Porcentaje de cenizas (media \pm desviación típica) de los distintos lotes de salchichones analizados en las diferentes etapas del proceso de elaboración (expresado en g cenizas/100 g sustancia seca).

Lotes	Amasado	Estufaje	Secado	Secado	Secado	Secado
			1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
A-Control	8,43 \pm 1,16	8,04 \pm 0,81	8,32 \pm 0,36	8,20 \pm 0,55	8,04 \pm 0,25	7,81 \pm 0,28
B-Bioconser. 1	8,96 \pm 0,92	8,54 \pm 0,39	8,65 \pm 0,34	8,62 \pm 0,44	8,32 \pm 0,66	8,30 \pm 0,79
C-Bioconser. 2	8,17 \pm 1,01	7,92 \pm 0,78	8,81 \pm 0,56	8,76 \pm 0,53	8,59 \pm 0,53	8,40 \pm 0,42
D-Cultivo 1	8,54 \pm 0,72	8,51 \pm 0,56	8,41 \pm 0,27	8,15 \pm 0,33	8,45 \pm 0,41	8,18 \pm 0,36
E-Cultivo 2	8,37 \pm 0,90	8,67 \pm 0,30	8,56 \pm 0,35	8,32 \pm 0,46	8,30 \pm 0,26	8,32 \pm 0,47

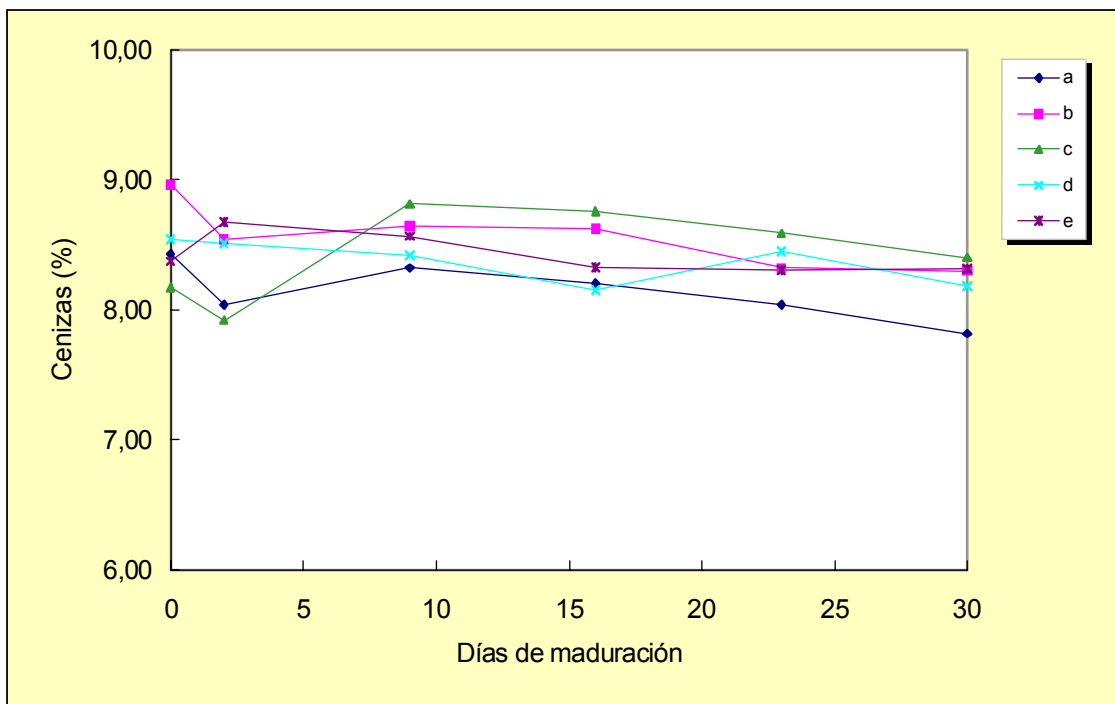


Figura 12. Evolución del porcentaje de cenizas de los distintos lotes de salchichones durante la maduración.

descenso fue desigual para los distintos lotes, siendo más acusado en los lotes de embutidos inoculados con cultivos iniciadores comerciales (lotes D y E) y menor en el inoculado con el bioconservador tipo 2.

Como puede apreciarse en la Figura 13, donde se representa la evolución de la cantidad de ácido láctico durante la maduración, los salchichones de los lotes D y E mostraron valores de ácido láctico superiores. Estas diferencias, con respecto al resto de embutidos, son estadísticamente significativas ($p < 0,001$) e indican que la adición de los cultivos iniciadores comerciales utilizados en la elaboración de los salchichones de los lotes D y E estimulan en mayor medida la producción de ácido láctico durante el proceso de maduración que el resto de aditivos lácticos empleados.

En cuanto a la evolución se han observado diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las distintas etapas de la maduración, siendo los valores obtenidos en el amasado inferiores al resto de etapas; y los obtenidos en el estufaje, primera y segunda semana superiores a los determinados en la tercera y cuarta semanas.

Las concentraciones de ácido láctico determinadas en los salchichones de los lotes D y E coinciden con las observadas por Kostenko *et al.* (1998) en embutidos inoculados con cultivos iniciadores de nueva generación (compuestos por una mezcla de bacterias ácido lácticas y micrococáceas) y con las obtenidas por Bello y Sánchez-Fuertes (1997) al inocular *Pediococcus pentosaceus* a embutidos. Estos valores son, sin embargo, inferiores a los determinados por Montel *et al.* (1992, 1993) en embutidos en los que se utilizaron cepas de *Lactobacillus sake* como cultivos iniciadores y donde obtuvieron concentraciones de ácido láctico superiores a 10 mmoles/100 g materia seca. No obstante, Garriga *et al.* (1988) no encontraron diferencias significativas en la producción de ácido láctico de embutidos con o sin cultivo iniciador.

Tabla 18. Cantidad de ácido láctico (media \pm desviación típica) de los distintos lotes de salchichones analizados en las diferentes etapas del proceso de elaboración (expresado en mmoles/100 g sustancia seca).

Lotes	Amasado	Estufaje	Secado			
			1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
A-Control	3,47 \pm 0,37	4,75 \pm 0,15	4,81 \pm 0,40	5,21 \pm 0,26	4,02 \pm 0,85	4,24 \pm 0,36
B-Bioconser. 1	3,63 \pm 0,21	4,95 \pm 0,85	5,08 \pm 1,06	5,02 \pm 0,41	4,59 \pm 0,12	4,23 \pm 0,60
C-Bioconser. 2	3,03 \pm 0,37	4,77 \pm 0,38	4,99 \pm 0,38	5,23 \pm 0,28	4,90 \pm 0,30	4,75 \pm 0,30
D-Cultivo 1	3,42 \pm 0,14	6,30 \pm 0,29	6,05 \pm 0,38	6,44 \pm 0,12	5,44 \pm 0,54	4,70 \pm 0,36
E-Cultivo 2	3,40 \pm 0,18	5,52 \pm 0,28	5,84 \pm 0,92	5,63 \pm 0,16	4,86 \pm 0,52	4,23 \pm 0,27

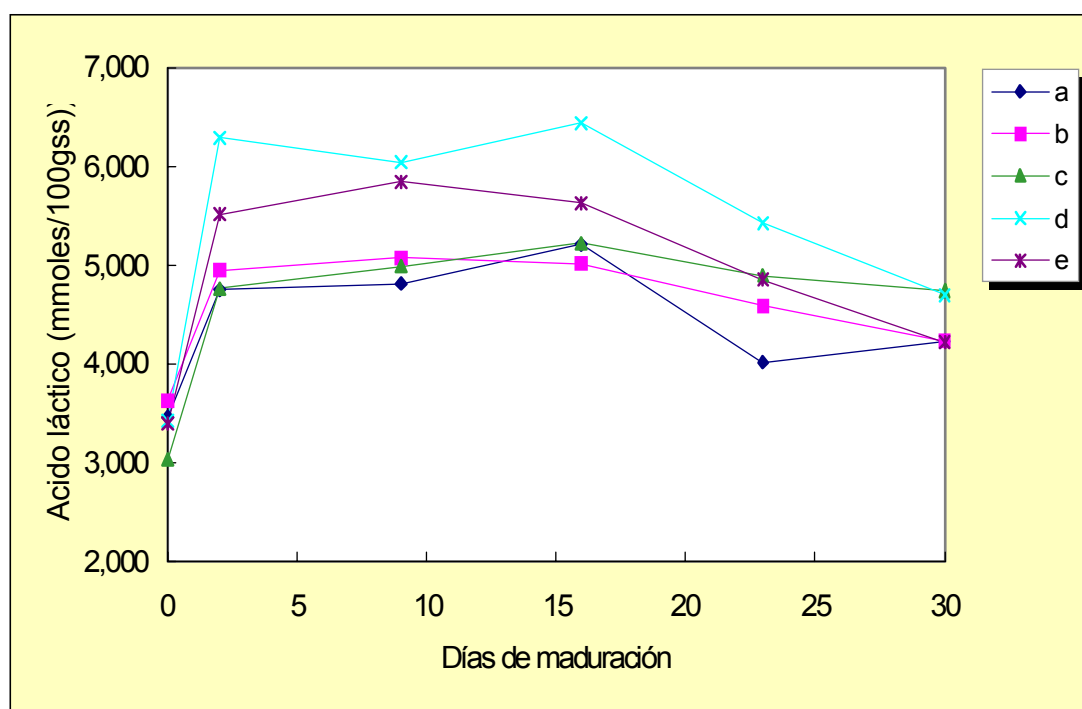


Figura 13. Evolución de la cantidad de ácido láctico de los distintos lotes de salchichones durante la maduración.

Por otro lado, en embutidos de maduración lenta Girard *et al.* (1989) obtuvieron concentraciones de 7-11 mmoles de ácido láctico, mientras que Lücke (1985) y Demeyer *et al.* (1992) determinaron concentraciones de 27,77 y 35,60 mmoles, respectivamente, en embutidos sin adición de cultivo iniciador.

La cantidad de ácido láctico está inversamente correlacionada con el pH ($r = -0,8238$; $p < 0,001$), esto se ha confirmado al comprobar que los valores más bajos de pH se corresponden con las máximas cantidades de ácido láctico determinadas, excepto en el día 16 que pese a no existir diferencias en el pH entre los distintos lotes de embutidos, la cantidad de ácido láctico fue más elevada en los salchichones de los lotes D y E que en el resto.

También se ha establecido una correlación altamente significativa entre el contenido de ácido láctico y el recuento de lactobacilos ($r = 0,8046$; $p < 0,001$); en este caso se ha comprobado que los mayores recuentos de lactobacilos, determinados en los embutidos inoculados con los cultivos comerciales (lotes D y E), coinciden con los máximos contenidos de ácido láctico.

III. 2. PARAMETROS QUIMICOS Y FISICO-QUIMCOS

III. 2. 1. Evolución del pH

En la Tabla 19 se muestran los valores medios y las desviaciones típicas estándar del pH de las muestras de salchichones analizados. Y en la Figura 14 se muestra la evolución de estos valores a lo largo de la maduración de los embutidos.

Como puede observarse en la Figura 14, durante la fase de estufaje se produce un descenso del pH, que es más acusado en los embutidos inoculados con los cultivos iniciadores (lotes D y E), y que supone una disminución de los valores iniciales (superiores a 6,0) de aproximadamente media unidad de pH en

los lotes A, B y C y de una unidad en los lotes D y E. Esta caída del pH se debe a la actividad fermentativa de los microorganismos involucrados en la maduración que producen sustancias capaces de liberar protones.

Durante las dos primeras semanas de secado se produce cierta estabilidad del pH que se mantiene prácticamente constante debido a la existencia de un equilibrio ácido-base entre las sustancias ácidas y las alcalinas de nueva formación. Esta relativa estabilidad no se aprecia en los embutidos de los lotes A y C, cuyo pH siguió descendiendo hasta el día 16. En este momento se alcanzaron los mínimos valores de pH en todos los lotes, excepto en el D y E que lo consiguen los días 2 y 9, respectivamente. Este valor mínimo puede interpretarse como el momento en el cual cesa la liberación de protones y en nuestro estudio osciló entre 5,16 para los lotes A y C y 5,25 para el E (Tabla 19). Finalmente en las últimas semanas de maduración se produce un ligero incremento, común para todos los lotes, que eleva el pH alrededor de 0,2 unidades, aunque en el lote C, este incremento fue mayor, concretamente de 0,37 unidades de pH. Esta subida puede deberse al predominio de sustancias alcalinas.

Durante la fermentación de los embutidos se produce una interacción entre el metabolismo de los carbohidratos y las proteínas que afecta a la concentración de protones. En las etapas iniciales de la maduración, la actividad proteolítica de las endopeptidasas microbianas (Vignolo *et al.*, 1988) y de las catepsinas de la carne (Demeyer y Samejima, 1991; Demeyer, 1992) liberan aminoácidos que pueden ser metabolizados por los microorganismos convirtiéndolos en compuestos básicos que provocan la elevación del pH en el producto final.

Estas diferencias de pH entre las distintas etapas de la maduración son significativas ($p < 0,001$), sin embargo, no se apreciaron diferencias entre los distintos lotes de embutidos ($p > 0,05$), a pesar de que en la etapa de estufaje el

Tabla 19. Valores de pH (media \pm desviación típica) de los distintos lotes de salchichones analizados en las diferentes etapas del proceso de elaboración.

Lotes	Amasado	Estufaje	Secado	Secado	Secado	Secado
			1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
A-Control	6,05 \pm 0,15	5,53 \pm 0,32	5,26 \pm 0,14	5,16 \pm 0,10	5,41 \pm 0,19	5,37 \pm 0,12
B-Bioconser. 1	6,01 \pm 0,17	5,41 \pm 0,34	5,27 \pm 0,12	5,23 \pm 0,12	5,35 \pm 0,24	5,44 \pm 0,21
C-Bioconser. 2	6,09 \pm 0,23	5,63 \pm 0,18	5,40 \pm 0,07	5,16 \pm 0,06	5,66 \pm 0,09	5,53 \pm 0,11
D-Cultivo 1	6,05 \pm 0,17	5,24 \pm 0,16	5,20 \pm 0,06	5,24 \pm 0,06	5,47 \pm 0,23	5,50 \pm 0,30
E-Cultivo 2	6,08 \pm 0,18	5,25 \pm 0,11	5,27 \pm 0,11	5,28 \pm 0,17	5,48 \pm 0,23	5,46 \pm 0,20

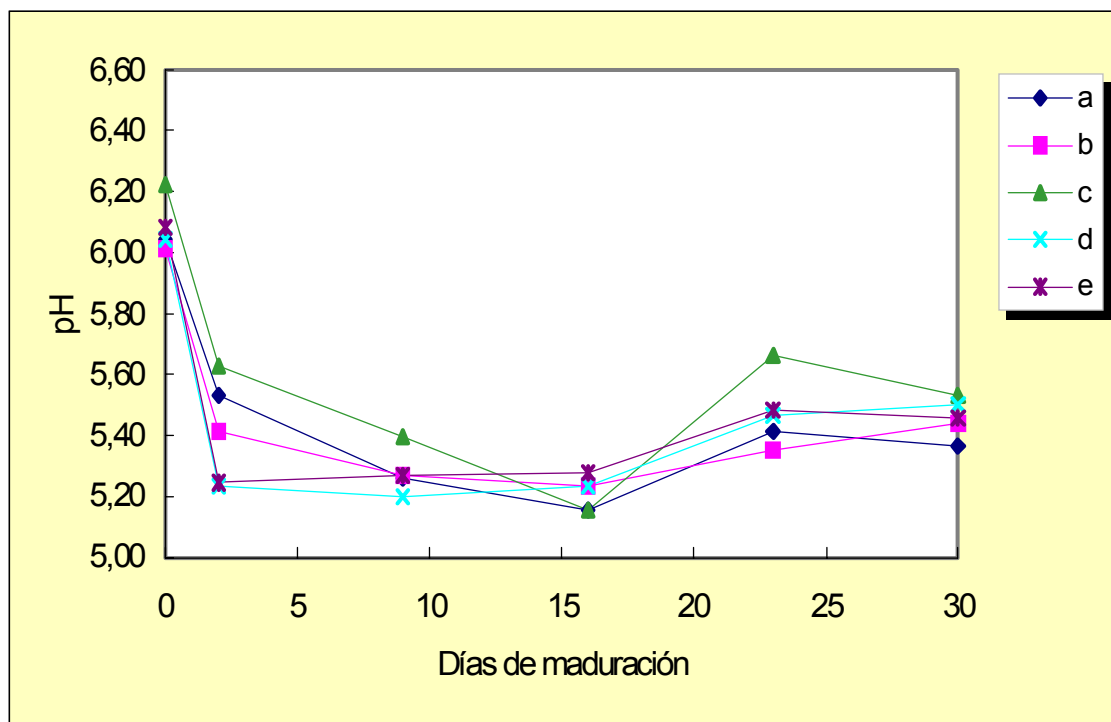


Figura 14. Evolución del pH en los salchichones analizados durante la maduración.

pH descendió más rápidamente en los embutidos de los lotes D y E, estas diferencias se atenúan a medida que avanza el proceso.

El proceso de acidificación observado en los salchichones estudiados se ajusta al descrito por Bello y Sánchez-Fuertes (1997) que afirman que el mayor descenso del pH se produce en el segundo día de maduración, coincidiendo con los mayores niveles de desarrollo microbiano, también aseguran que en el tercer día se inicia una fase estacionaria y a partir del día 14 se produce un ligero incremento del pH. Asimismo, Montel *et al.* (1993) en salchichones inoculados con cultivos compuestos por cepas de *Lactobacillus sake* obtuvieron mayor descenso del pH tras el estufaje que en los salchichones sin cultivo iniciador.

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 (Ibáñez *et al.*, 1996; Montel *et al.*, 1993; Kostenko *et al.*, 1998; Córdoba y Fernández-Salguero, 1988; Serrano, 1979) 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 (Gorospe *et al.*, 1989; Astiasarán *et al.*, 1990a; Demeyer *et al.*, 1992; Chasco *et al.*, 1993; Bello y Sánchez-Fuertes, 1997).

Se han establecido correlaciones entre el valor de pH y el contenido de ácido láctico de las muestras analizadas ($r = -0,8238$; $p < 0,001$), de forma que los menores valores de pH coinciden con las mayores concentraciones de ácido láctico en el día 16 de maduración, lo cual confirma que el ácido láctico es la molécula de mayor influencia en la definición del pH. Por otro lado, también se ha establecido una correlación negativa muy significativa ($p < 0,001$) entre el pH y el contenido de NNP en el embutido, que indica que la proteólisis es más intensa en medios ácidos, esto ha sido comprobado previamente en otras investigaciones (Lois *et al.*, 1987; Verplaetse *et al.*, 1992; Flores *et al.*, 1997).

Finalmente, se ha observado una correlación altamente significativa entre la evolución del pH y el contenido de nitritos durante la maduración de los embutidos ($r = 0,8708$; $p < 0,001$). El fuerte descenso del pH en el estufaje coincide con la reducción del 70 % del nitrito inicial, esto es debido a que a pH inferior a 5,5 se produce la reducción de los nitritos a óxido nítrico, que se lleva a cabo por la presencia de sustancias reductoras en el medio acidificado o por la acción de microorganismos reductores.

La flora microbiana presente en los embutidos también se ve afectada por el pH. Se ha observado una correlación negativa entre el pH y el recuento de lactobacilos ($r = -0,8194$; $p < 0,001$), que indicaría que los menores valores de pH coinciden con los mayores recuentos de lactobacilos, no obstante, en nuestro caso, esta premisa sólo se cumple exactamente en los embutidos inoculados con los cultivos iniciadores comerciales (lotes D y E) después del estufaje (día 2). Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por Ibáñez *et al.* (1996) que en embutidos inoculados con un cultivo compuesto por *Lactobacillus plantarum* y *Staphylococcus carnosus* comprobaron que la mayor acidificación coincide con los mayores recuentos de flora láctica.

Por otro lado, el descenso del pH también se refleja en el desarrollo de la flora Gram negativa (enterobacterias y coliformes), que disminuye a medida que se reduce el pH; en nuestro estudio se establece una correlación positiva significativa entre el pH y las enterobacterias, y entre el pH y los coliformes; con un coeficiente de $r = 0,5723$ y $r = 0,5707$, respectivamente. Este hecho está suficientemente contrastado y algunos autores afirman que la flora Gram negativa puede llegar incluso a desaparecer inhibida por el descenso del pH y por el predominio de la flora láctica (Coretti, 1971; Lücke, 1987).

III. 2. 2. Cantidad de cloruro sódico

La cantidad media de cloruro sódico (expresado como g NaCl/100 g materia seca) y la molalidad del NaCl en la fase acuosa de los embutidos analizados se muestran en las Tablas 20 y 21. La evolución de estos parámetros a lo largo de la maduración se representa en las Figuras 15 y 16.

Como se puede observar en la Figura 15, la cantidad de NaCl permanece prácticamente constante durante todo el proceso con un valor medio (Tabla 20) de 5,18 g/100 g materia seca, no apreciándose diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las distintas etapas de la maduración. No obstante, cuando consideramos la concentración de sal en la fase acuosa (molalidad), en la que la sal se encuentra disuelta, se observa (Figura 16) un incremento desde valores iniciales, comprendidos entre 0,49-0,55 %, hasta finales que oscilaron entre 1,15-1,45 %; esto supuso un incremento superior a 2,6 veces la concentración inicial. En este caso se observa que existen diferencias significativas ($p < 0,001$) entre las diferentes etapas del proceso, excepto entre las de amasado y estufaje, produciéndose un incremento progresivo desde los valores iniciales. En cuanto a las diferencias entre lotes, se ha observado que los embutidos inoculados con el bioconservador tipo 2 (lote C) presentaron unos valores de molalidad del NaCl ligeramente inferiores ($p < 0,05$) que el resto de embutidos, estas diferencias pueden ser debidas a una mayor dilución de la sal, ya que el contenido acuoso de estos embutidos al final de la maduración fue ligeramente más elevado que en el resto ($p > 0,05$).

Los valores de NaCl obtenidos en este trabajo son similares a los determinados por (Serrano, 1979; Beriain *et al.*, 1989; Cid *et al.*, 1993) aunque ligeramente inferiores a los mostrados por otros autores que obtuvieron porcentajes superiores a 6,00 para salchichones de características análogas (Chasco *et al.*, 1992a-1992b; Beriain *et al.*, 1993).

Tabla 20. Cantidad de cloruro sódico (media \pm desviación típica) de los distintos lotes de salchichones analizados en las diferentes etapas del proceso de elaboración (expresado en g NaCl/100 g sustancia seca).

Lotes	Amasado	Estufaje	Secado			
			1 ^a semana	2 ^a semana	3 ^a semana	4 ^a semana
A-Control	5,05 \pm 0,51	5,22 \pm 0,36	5,10 \pm 0,27	5,38 \pm 0,28	5,31 \pm 0,30	4,98 \pm 0,21
B-Bioconser. 1	5,56 \pm 0,71	5,25 \pm 0,85	5,16 \pm 0,29	5,30 \pm 0,42	5,32 \pm 0,52	5,19 \pm 0,57
C-Bioconser. 2	4,27 \pm 0,47	4,72 \pm 1,07	5,22 \pm 0,61	5,20 \pm 0,14	5,56 \pm 0,26	5,20 \pm 0,91
D-Cultivo 1	4,60 \pm 0,87	5,18 \pm 0,45	5,30 \pm 0,28	4,94 \pm 0,44	5,35 \pm 0,43	5,13 \pm 0,29
E-Cultivo 2	4,83 \pm 0,84	5,74 \pm 0,71	5,54 \pm 0,31	5,38 \pm 0,43	5,42 \pm 0,35	5,15 \pm 0,31

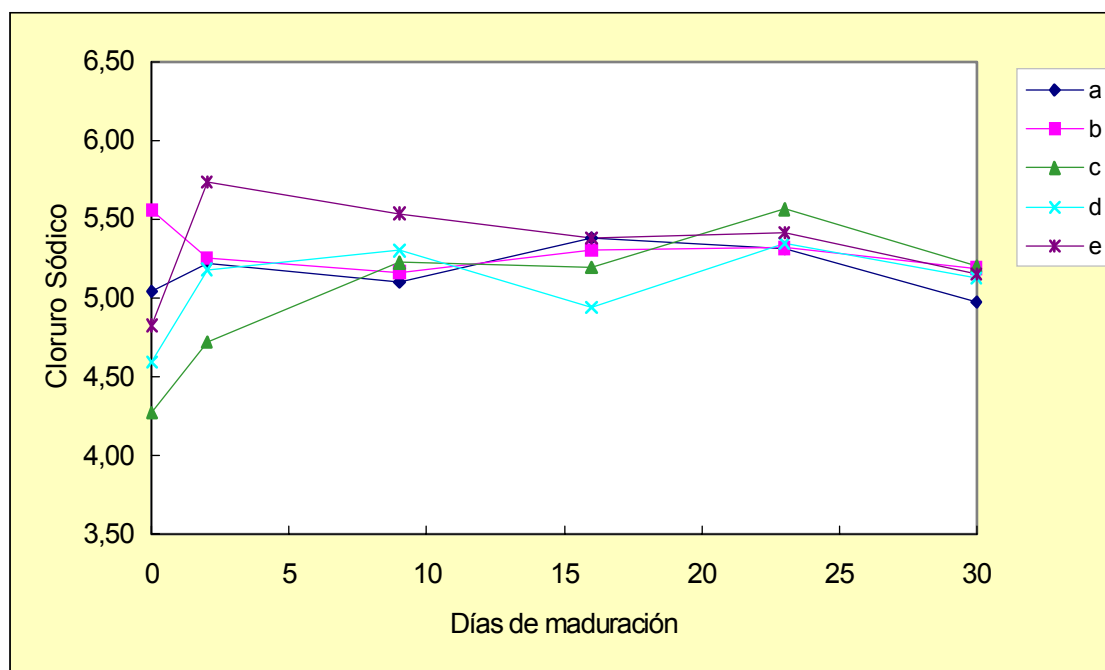


Figura 15. Evolución de la cantidad de cloruro sódico en los distintos lotes de salchichones durante la maduración.

Tabla 21. Molalidad del cloruro sódico en la fase acuosa (media \pm desviación típica) de los diferentes lotes de salchichones analizados en las distintas etapas del proceso de elaboración.

Lotes	Amasado	Estufaje	Secado			
			1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
A-Control	0,55 \pm 0,03	0,57 \pm 0,03	0,68 \pm 0,07	0,89 \pm 0,08	1,18 \pm 0,09	1,45 \pm 0,06
B-Bioconser. 1	0,53 \pm 0,03	0,56 \pm 0,07	0,67 \pm 0,08	0,83 \pm 0,14	1,11 \pm 0,15	1,37 \pm 0,15
C-Bioconser. 2	0,49 \pm 0,04	0,53 \pm 0,11	0,62 \pm 0,05	0,76 \pm 0,04	1,04 \pm 0,03	1,30 \pm 0,23
D-Cultivo 1	0,49 \pm 0,09	0,55 \pm 0,05	0,72 \pm 0,10	0,86 \pm 0,13	1,10 \pm 0,10	1,43 \pm 0,10
E-Cultivo 2	0,52 \pm 0,06	0,61 \pm 0,06	0,72 \pm 0,10	0,92 \pm 0,13	1,17 \pm 0,14	1,38 \pm 0,06

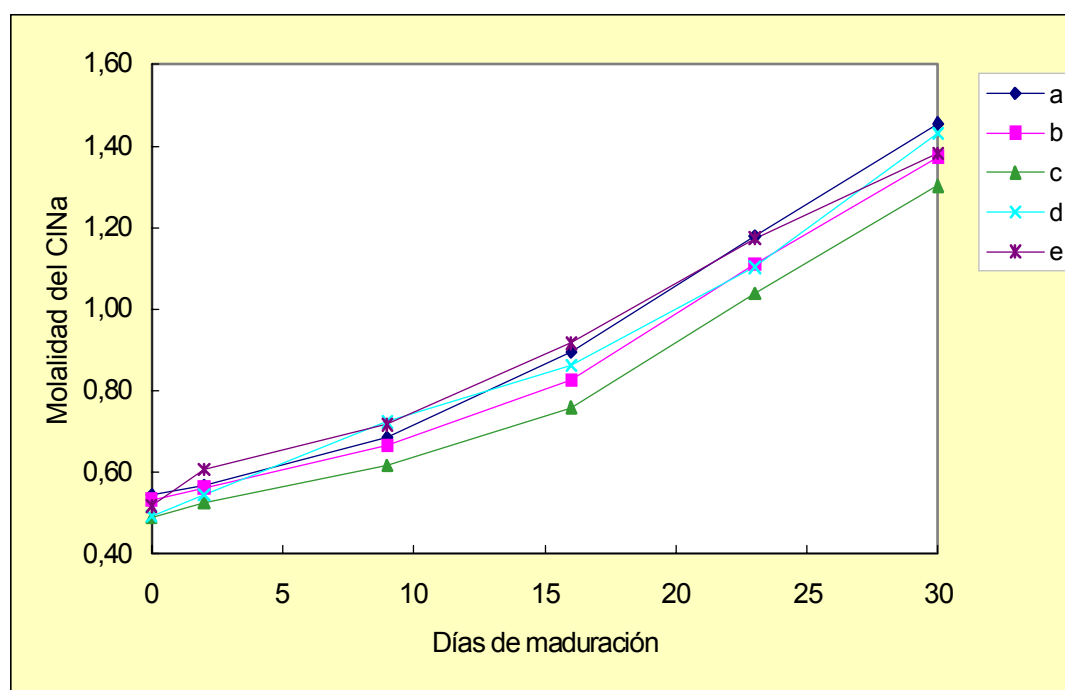


Figura 16. Evolución de la molalidad del NaCl en la fase acuosa de los distintos lotes de salchichones durante la maduración.

En cuanto a la molalidad del NaCl, Córdoba y Fernández-Salguero (1988) obtuvieron valores próximos a los nuestros y Serrano (1979) cuantificó, al final del proceso, un incremento de la concentración de sal en la fase acuosa de 2,8 veces la inicial.

Por otro lado, se ha establecido una correlación negativa altamente significativa entre la molalidad del NaCl y el contenido acuoso de la muestra ($r = 0,9596$, $p < 0,001$).

III. 2. 3. Evolución de la actividad de agua (a_w)

Los valores medios y desviaciones típicas de la actividad de agua (a_w) de los salchichones analizados se exponen en la Tabla 22, y en la Figura 17 se representa la evolución de estos valores a lo largo de la maduración de los embutidos.

La a_w disminuyó paulatinamente desde valores iniciales próximos a 0,980 hasta 0,928 para los lotes A, B y D y 0,925 para el E. Los embutidos del lote C consiguieron una a_w final de 0,936.

Como se puede apreciar en la Figura 17, hasta los 9 días de maduración la reducción de la a_w fue similar para todos los lotes, pero a partir de este momento los salchichones del lote C presentaron una disminución de la a_w menos acusada que el resto y que marca las diferencias entre los distintos lotes al final del proceso. Las diferencias entre los embutidos del lote C y el resto fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) al igual que las observadas a lo largo de la maduración ($p < 0,001$) entre las distintas etapas del proceso.

Se ha establecido una correlación positiva altamente significativa entre la a_w y el porcentaje de humedad del producto ($r = 0,9142$; $p < 0,001$) y se ha comprobado que los valores de a_w más altos coinciden con los mayores

contenidos de agua observados en el mismo. Otro parámetro que presenta una correlación positiva con la a_w es el pH, según Stiebing y Rödel (1988) el patrón de desecación en embutidos crudos curados está influenciado entre otros factores por el pH. En nuestro caso se ha observado que en el producto final el lote que presenta el mayor valor de pH coincide con el que tiene mayor a_w (lote C); no obstante esta correlación no siempre se produce (Ibáñez *et al.*, 1996).

Los valores de a_w observados en este estudio son ligeramente más elevados que los determinados por otros autores (Córdoba y Fernández-Salguero, 1988; Astiasarán *et al.*, 1990b; Chasco *et al.*, 1992a; Beriain *et al.*, 1993; Ibáñez *et al.*, 1996) aunque estarían dentro del rango de a_w estimado por Leistner y Wirth (1972) para embutidos fermentados que oscila entre 0,83 y 0,96 con una media de 0,91. No obstante, los valores de a_w observados al final del estudio, comprendidos entre 0,925 y 0,936, superaron el límite mínimo de 0,91 de a_w establecido por Chiriffe y Favetto (1992) para inhibir a todos los patógenos, excepto a *Staphylococcus aureus*, en condiciones aeróbicas. A pesar de la a_w elevada al final del proceso este hecho no constituye un riesgo para la estabilidad del producto ya que la posible presencia de microorganismos patógenos y contaminantes queda inhibida por la actuación de los nitritos, los cuales se incluyen en la secuencia de obstáculos que contribuyen a la estabilización de los embutidos crudos curados (Leistner, 1994).

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 (Leistner, 1987). En nuestro caso se ha observado una relación directa entre la a_w y los recuentos de enterobacterias y coliformes, con un factor de correlación de $r = 0,7910$ y $r = 0,5715$ ($p < 0,001$), respectivamente. 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

Tabla 22. Valores de la a_w (media \pm desviación típica) de los distintos lotes de salchichones analizados en las diferentes etapas del proceso de elaboración.

Lotes	Amasado	Estufaje	Secado	Secado	Secado	Secado
			1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
A-Control	0,975 \pm 0,003	0,973 \pm 0,003	0,965 \pm 0,005	0,950 \pm 0,008	0,942 \pm 0,007	0,928 \pm 0,007
B-Bioconser. 1	0,977 \pm 0,004	0,971 \pm 0,002	0,962 \pm 0,003	0,955 \pm 0,015	0,943 \pm 0,011	0,928 \pm 0,010
C-Bioconser. 2	0,980 \pm 0,004	0,971 \pm 0,003	0,965 \pm 0,002	0,960 \pm 0,007	0,950 \pm 0,007	0,936 \pm 0,003
D-Cultivo 1	0,982 \pm 0,002	0,968 \pm 0,003	0,960 \pm 0,007	0,949 \pm 0,010	0,942 \pm 0,005	0,928 \pm 0,007
E-Cultivo 2	0,979 \pm 0,002	0,966 \pm 0,004	0,963 \pm 0,006	0,948 \pm 0,008	0,942 \pm 0,010	0,925 \pm 0,008

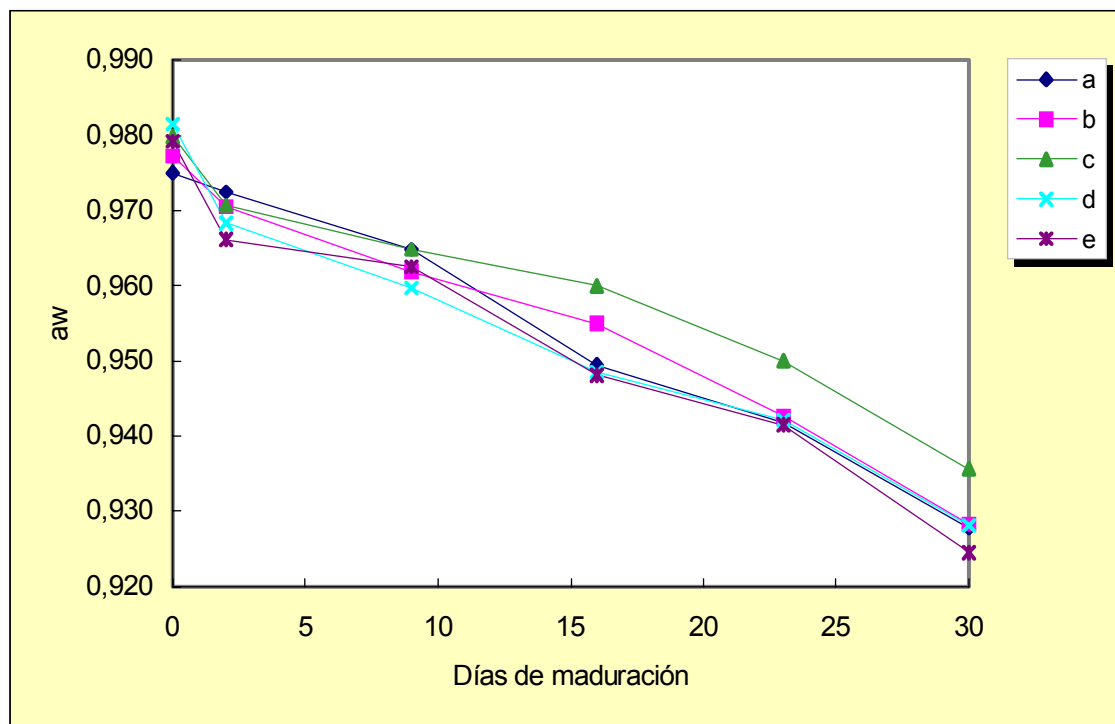


Figura 17. Evolución de la actividad de agua en los distintos lotes de salchichones durante el proceso de maduración.

de estos microorganismos favorece el desarrollo de la flora beneficiosa responsable de la maduración: micrococáceas (estafilococos y micrococos) y bacterias ácido-lácticas.

Por otro lado se establece una correlación negativa entre la a_w y el porcentaje de pérdida de peso del producto (mermas) ($r = - 0,9073$; $p < 0,001$), de forma que la disminución de la a_w se produce de forma simultánea al incremento de las pérdidas de peso. También se establece una relación negativa entre la a_w y la molalidad del cloruro sódico en la fase acuosa ($r = - 0,9336$; $p < 0,001$) que indica que la reducción de la a_w coincide con un aumento en la concentración de los solutos en la fase acuosa. En los productos cárnicos de humedad alta (bacon, butifarra, productos cocidos, paté...) es posible calcular la a_w en función de la molalidad del cloruro sódico en la fase acuosa a través de una ecuación predictiva utilizada por Fernández-Salguero y Llinares (1985):

$$a_w = 1,0048 - 0,0386 m$$

Esta ecuación también ha sido utilizada con total validez en quesos con más del 40% de humedad (Marcos *et al.*, 1981) y en productos pesqueros enlatados (Gómez *et al.*, 1987).

En la Tabla 23 se muestran los valores obtenidos al calcular la a_w a partir de la ecuación anterior, asimismo aparecen los valores de la a_w determinada experimentalmente y la diferencia entre ambas. Como puede observarse, la a_w calculada según la ecuación (a_{wc}) fue en todos los casos superior a la a_w experimental (a_{we}). Esto es lógico ya que en el salchichón, además del cloruro sódico, existen otros minerales que reducen adicionalmente la a_w así como compuestos procedentes de la hidrólisis de las proteínas y de la fermentación de los azúcares fundamentalmente, que también contribuyen a la reducción de la a_w .

Tabla 23. Actividad de agua experimental ($a_{w,e}$) y calculada ($a_{w,c}^*$) y diferencia entre ambas de los distintos lotes de salchichones analizados en las diferentes etapas del proceso de elaboración...

Lotes	Amasado		Estufaje		Secado 1ª semana		Secado 2ª semana		Secado 3ª semana		Secado 4ª semana					
	$a_{w,e}$	$a_{w,c}^* - a_{w,e}$	$a_{w,e}$	$a_{w,c}^* - a_{w,e}$	$a_{w,e}$	$a_{w,c}^* - a_{w,e}$	$a_{w,e}$	$a_{w,c}^* - a_{w,e}$	$a_{w,e}$	$a_{w,c}^* - a_{w,e}$	$a_{w,e}$	$a_{w,c}^* - a_{w,e}$				
A	0,984	0,975	0,983	0,973	0,978	0,965	0,014	0,970	0,950	0,021	0,959	0,942	0,017	0,949	0,928	0,021
B	0,984	0,977	0,983	0,971	0,979	0,962	0,017	0,973	0,955	0,018	0,962	0,943	0,019	0,952	0,928	0,023
C	0,986	0,980	0,984	0,971	0,981	0,965	0,016	0,976	0,960	0,016	0,965	0,950	0,015	0,955	0,936	0,019
D	0,986	0,982	0,984	0,968	0,977	0,960	0,017	0,972	0,949	0,023	0,962	0,942	0,020	0,950	0,928	0,021
E	0,985	0,979	0,981	0,966	0,977	0,963	0,015	0,969	0,948	0,021	0,959	0,942	0,018	0,951	0,925	0,027

$a_{w,c}^*$ = Actividad de agua calculada a partir de la ecuación: $a_w = 1,0048 - 0,0386 m$.

$a_{w,e}$ = Actividad de agua experimental.

Al estudiar las diferencias entre la a_{wc} y a_{we} (Tabla 23) puede comprobarse que en las etapas de amasado, estufaje y primera semana de secado estas diferencias son mínimas, no superando el valor de 0,02, que es el límite considerado por Labuza *et al.* (1976) como diferencia aceptable entre dos métodos. Por tanto, se considera que el cálculo de la a_w a través de la mencionada ecuación es suficientemente exacto para los salchichones en los primeros estadíos de la maduración. Sin embargo, en la segunda, tercera y cuarta semana de secado, las diferencias entre la a_{wc} y a_{we} fueron en algunos casos superiores a 0,02, por lo que no es aconsejable la utilización de esta ecuación para el cálculo de la a_w . Esto fue previamente observado por Fernández-Salguero *et al.* (1995), que constataron que en los productos cárnicos de humedad alta era posible calcular la a_w en función de la molalidad con bastante exactitud, pero en los productos cárnicos de humedad intermedia (salchichón, chorizo, salami, jamón curado...) no es posible la utilización de la esta ecuación, ya que en estos productos intervienen otros solutos y compuestos de bajo peso molecular liberados durante la maduración que reducen adicionalmente la a_w (Fernández-Salguero *et al.*, 1994).

III. 2. 4. Cantidad de nitritos

Los valores medios de nitrito residual con sus desviaciones típicas (expresados como ppm de NaNO_2 /100g materia seca) de los distintos lotes de salchichones analizados se muestran en la Tabla 24. En la Figura 18 se representa la evolución de estos datos a lo largo de la maduración.

Como se puede apreciar en la Tabla 24, la concentración inicial de nitritos sufrió un brusco descenso durante la fase de estufaje, cayendo los valores desde 104,63 (lote A) y 113,88 (lote C) ppm de nitrito, hasta valores comprendidos entre 22,38 y 30,77 ppm para los lotes C y B, respectivamente; esto supone un descenso superior al 70% del nitrito inicial.

Tabla 24. Cantidad de nitrito residual (media \pm desviación típica) de los distintos lotes de salchichones analizados en las diferentes etapas del proceso de maduración (expresado en ppm $\text{NaNO}_2/100$ g sustancia seca).

Lotes	Amasado	Estufaje	Secado			
			1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
A-Control	104,63 \pm 10,03	26,41 \pm 4,92	2,46 \pm 1,17	4,46 \pm 2,14	4,54 \pm 2,37	3,31 \pm 1,13
B-Bioconser. 1	107,33 \pm 23,72	30,77 \pm 9,43	3,09 \pm 1,75	4,27 \pm 0,61	4,94 \pm 2,41	3,54 \pm 0,92
C-Bioconser. 2	113,88 \pm 16,65	22,38 \pm 9,57	4,61 \pm 1,55	6,05 \pm 0,81	4,79 \pm 0,83	5,12 \pm 1,99
D-Cultivo 1	110,69 \pm 17,58	25,24 \pm 10,63	4,07 \pm 1,43	5,45 \pm 1,36	4,84 \pm 1,79	4,12 \pm 1,42
E-Cultivo 2	107,01 \pm 9,83	26,93 \pm 5,61	4,02 \pm 1,32	4,76 \pm 0,99	4,24 \pm 1,48	3,35 \pm 1,26

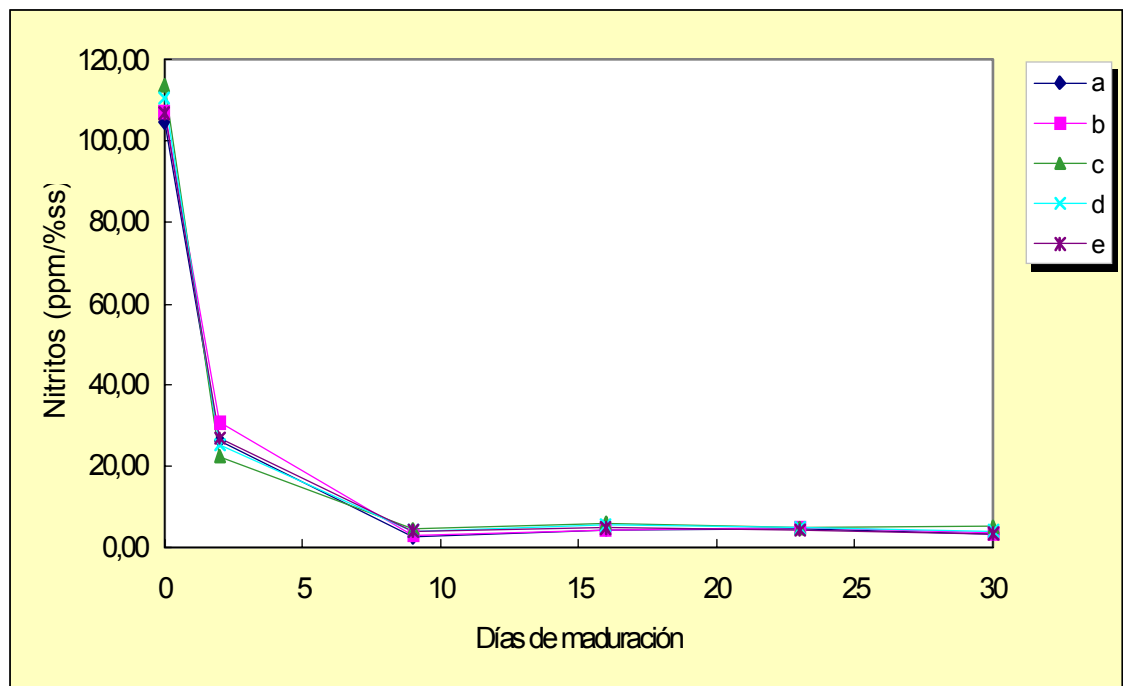


Figura 18. Evolución de la cantidad de nitrito residual de los distintos lotes de salchichones durante la maduración.

Durante la primera semana de maduración la concentración de nitritos continuó descendiendo hasta valores inferiores a 5 ppm, a partir de este momento se estabilizó y no llegó a superar las 6 ppm de nitrito en el resto de la maduración. Las concentraciones obtenidas al final del proceso no superaron en ningún caso el límite máximo permitido por la Legislación Alimentaria Española que establece una concentración de nitrito residual máxima de 50 ppm de NaNO_2 para embutidos crudos curados (Presidencia del Gobierno, 1997).

La drástica reducción de los niveles de nitrito residual en embutidos puede explicarse por la elevada reactividad de este compuesto, según Wirth (1991) partiendo de niveles iniciales de aproximadamente 100 ppm de nitrito, después de 10 días de fermentación la concentración de nitrito se reduce a 10-20 ppm y después de 30 días de maduración queda reducido a menos de 10 ppm.

En la Figura 18 se observa el brusco descenso del nitrito inicial, siendo los valores obtenidos en las etapas de amasado y estufaje estadísticamente diferentes que los obtenidos en el resto de etapas ($p < 0,001$). No obstante, no se observaron diferencias significativas entre los embutidos inoculados con distintos aditivos lácticos ($p > 0,05$).

Los valores obtenidos en este estudio son similares a los observados por otros autores, que no superan las 10 ppm de nitrito residual al final de la maduración de los embutidos (Gorospe *et al.*, 1989; Beriain *et al.*, 1993; Ibáñez *et al.*, 1996). No obstante Rincón *et al.* (1983) estimaron una concentración de nitritos en salchichones de 11,23 ppm, y Machinski (1996) obtuvo un valor medio de 28,82 ppm de nitrito en salchichones de diferentes marcas comerciales.

La concentración final de nitrito en los embutidos está en gran medida condicionada por el pH del producto, ya que el pH ácido favorece la reducción del nitrito a óxido nítrico, en este caso se ha comprobado una correlación positiva

entre el pH y la concentración de nitritos ($r = 0,7152$; $p < 0,001$), de forma que el descenso del pH provoca la reducción de la concentración de nitrato residual.

III. 2. 5. Evolución del nitrógeno no proteico (NNP)

Los valores de NNP, expresados como g NNP/100 g nitrógeno total (NT), para cada uno de los lotes de salchichones analizados se exponen en la Tabla 25. Y en la Figura 19 se representa la evolución del contenido de NNP a lo largo de la maduración.

Como puede observarse los valores estimados en la fase de amasado (día cero) sufren un incremento progresivo desde niveles comprendidos entre 5,51 y 6,17 % NT hasta valores de 7,50-8,00 % a los 30 días de maduración. Esta diferencia supone un incremento que oscila entre el 19 % y el 31 % de los valores de NNP iniciales. En el análisis estadístico no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los distintos lotes de embutidos, aunque en la Figura 19, puede apreciarse que existe un incremento del NNP a lo largo de la maduración que origina diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las etapas del proceso, excepto entre las fases de amasado y estufaje.

El incremento de la concentración del NNP a medida que se desarrolla la maduración ha sido puesto de manifiesto por numerosos autores (Astiasarán *et al.*, 1990b; DeMasi *et al.*, 1990; Cid *et al.*, 1992; Flores *et al.*, 1997), sin embargo Ibáñez *et al.* (1997) obtuvieron una evolución del NNP muy diferente, los valores iniciales (11,8 g NNP/100 g NT) descendían tras el estufaje hasta 5,3 para elevarse hasta 17,3 (% NT) a los 17 días de maduración y volver a descender hasta 15,0 (% NT) al final del proceso (24 días). Asimismo, León *et al.* (1978) partiendo de valores iniciales de 4,66 g NNP/100 g materia seca observaron un aumento progresivo del NNP hasta el día 16 de maduración, donde se alcanzaron los máximos valores (5,56 g NNP) para descender

Tabla 25. Cantidad de NNP (media \pm desviación típica) de los diferentes lotes de salchichones analizados en las distintas etapas del proceso de elaboración (expresado en % NT).

Lotes	Amasado	Estufaje	Secado			
			1 ^a semana	2 ^a semana	3 ^a semana	4 ^a semana
A-Control	6,05 \pm 0,56	5,93 \pm 0,18	6,31 \pm 0,29	6,95 \pm 0,21	7,30 \pm 0,40	7,50 \pm 0,29
B-Bioconser. 1	5,52 \pm 1,00	5,98 \pm 0,63	6,55 \pm 0,45	6,92 \pm 0,30	7,67 \pm 0,55	8,00 \pm 0,74
C-Bioconser. 2	6,17 \pm 0,58	6,00 \pm 0,30	6,02 \pm 0,32	6,40 \pm 0,23	6,68 \pm 0,18	7,56 \pm 0,34
D-Cultivo 1	5,51 \pm 0,41	5,66 \pm 0,55	6,68 \pm 0,65	7,33 \pm 0,27	7,46 \pm 0,22	7,94 \pm 0,16
E-Cultivo 2	5,69 \pm 0,36	6,11 \pm 0,21	6,51 \pm 0,56	7,19 \pm 0,46	7,54 \pm 0,60	7,52 \pm 0,44

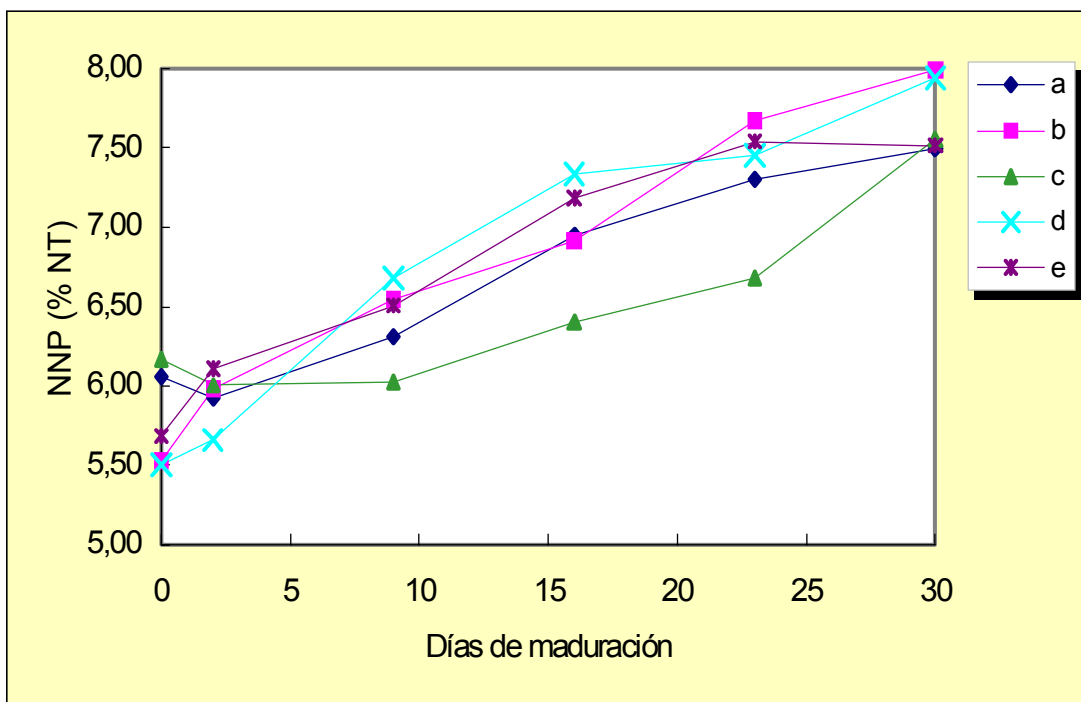


Figura 19. Evolución del NNP en los distintos lotes de salchichones durante la maduración.

posteriormente hasta 5,24 g NNP, valor que se determinó al final de la maduración. Estos valores sólo supusieron un incremento del 11 % sobre el valor inicial.

Los valores finales de NNP obtenidos en este trabajo son similares a los encontrados por Garriga *et al.* (1988), DeMasi *et al.* (1990) y Beriain *et al.* (1993). Aunque son ligeramente superiores a los obtenidos por Córdoba y Fernández-Salguero (1988) en salchichones de diferentes categorías; e inferiores a los determinados por Cid *et al.* (1992) e Ibáñez *et al.* (1997) que obtuvieron niveles de 20,5 y 15,0 (% NT), respectivamente, en salchichones con cuatro semanas de maduración. Los valores finales determinados por estos autores (DeMasi *et al.*, 1990; Astiasarán *et al.*, 1990b; Cid *et al.*, 1992) suponen un incremento del NNP sobre los niveles iniciales de aproximadamente el 40 %, que coinciden con los observados previamente por Wardlaw *et al.* (1973) y Dierick *et al.* (1974) en embutidos fermentados, aunque son superiores a los observados por nosotros que oscilaron entre el 19 y el 31 %. No obstante, los incrementos de NNP obtenidos (Tabla 25) son semejantes a los determinados para otros embutidos de mezcla, como el chorizo de picado grueso (Astiasarán *et al.*, 1990a; Beriain *et al.*, 1990). Según Cid *et al.* (1992), los productos con un grado más intenso de picado de la materia prima, sufren un mayor aumento del NNP durante la curación que los productos que mantienen más íntegra la estructura de su tejido muscular, ya que la rotura de las fibras facilita la actuación de las enzimas proteolíticas endógenas.

Otro factor que favorece la actividad proteolítica es la acidificación (Astiasarán *et al.*, 1990b; Burgos, 1981). En este estudio se ha observado que existe una correlación inversa altamente significativa ($p < 0,001$) entre el pH y el contenido de NNP, de forma que a medida que desciende el pH incrementa la fracción de NNP presente en la muestra. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Lois *et al.* (1987), Verplaetse *et al.* (1992) y Flores *et al.* (1997)

que señalaron que la hidrólisis proteica incrementaba en medio ácido. Distintos autores han tratado de explicar este fenómeno y coinciden en señalar que cuando el pH desciende por debajo de 5,4, la acidificación que se produce favorece la desnaturalización e insolubilización de las proteínas, y especialmente de las proteínas miofibrilares que son más susceptibles a la proteólisis enzimática de origen microbiano (Klement y Cassens, 1974; Klement *et al.*, 1974).

Como se ha mencionado anteriormente, existen diferentes opiniones sobre la participación de los microorganismos en los fenómenos de proteólisis y lipólisis durante la maduración de los embutidos crudos curados. La actuación de las bacterias lácticas en los fenómenos de proteólisis es muy discutida, y aunque numerosos autores las consideran responsables de una importante acción proteolítica (Naes y Nissen-Meyer, 1992; Naes *et al.*, 1995; Hagen *et al.*, 1996; Montel *et al.*, 1992, 1995; Fadda *et al.*, 1998) otros autores han señalado que esta actividad es nula o muy débil (Law y Kolstad, 1983).

En cuanto a las *micrococáceas*, parece existir consenso en lo que se refiere a su participación en la degradación proteica. Su actividad proteolítica y lipolítica ha sido demostrada en numerosas ocasiones (Nordal y Slide, 1980; Lücke, 1987; Sanz *et al.*, 1988) y se ha observado que mayores recuentos en el número de micrococáceas coincide con un incremento en la proteólisis (Ibáñez *et al.*, 1996). En nuestro estudio se ha establecido una correlación positiva ($r = 0,6823$; $p < 0,001$) entre el contenido de NNP y el número de micrococáceas en el embutido y se ha comprobado que, en cada etapa de la maduración, los embutidos que presentaron mayores recuentos de Micrococaeas coincidían con los que tenían mayores valores de NNP.

III. 3. MODIFICACION DE LOS INDICES DE OXIDACIÓN DE LA GRASA DURANTE LA MADURACION

III. 3. 1. Evolución del índice de peróxidos

En la Tabla 26 se recogen los valores medios y las desviaciones típicas del índice de peróxidos (expresado como meq. O₂/kg grasa) de los distintos lotes de salchichones analizados. En la Figura 20 se representa la evolución de estos valores a lo largo de la maduración.

Los peróxidos se generan en los embutidos crudos curados a partir de los ácidos grasos libres liberados durante la lipólisis (Cantoni, 1967). Como puede apreciarse en la Figura 20 el índice de peróxidos inicial, con valores comprendidos entre 10,49 y 16,61 (meq O₂/kg grasa), disminuyó ligeramente durante la fase de estufaje y sufrió un aumento en las dos primeras semanas de maduración. Este incremento alcanzó sus valores máximos a los 16 días, donde se determinaron índices en el rango de 11,88-20,03, excepto los salchichones del lote E, que mostraron su máximo valor en el amasado. A partir del día 16 comenzó un nuevo descenso que se prolongó durante la tercera semana para estabilizarse o subir ligeramente en la cuarta. Los valores en el producto final fueron muy similares a los iniciales, aunque ligeramente más bajos. Las diferencias observadas entre las distintas etapas de la maduración fueron estadísticamente significativas ($p < 0,001$) aunque no se apreciaron diferencias significativas entre los salchichones adicionados de los distintos aditivos lácticos ($p > 0,05$).

La disminución de los valores iniciales de peróxidos durante los primeros días de maduración, fue observada previamente por Rozier (1969) que atribuye este descenso a la posible transformación de estos en compuestos carbonilos, lo cual, a su vez, supone un aumento del valor de TBA.

Tabla 26. Índices de peróxidos (media \pm desviación típica) de los diferentes lotes de salchichones analizados en las distintas etapas del proceso de elaboración (expresado en meq O₂/kg grasa).

Lotes	Amasado	Estufaje	Secado			
			1 ^a semana	2 ^a semana	3 ^a semana	4 ^a semana
A-Control	10,70 \pm 0,82	11,22 \pm 5,98	10,56 \pm 0,86	13,01 \pm 8,40	8,21 \pm 5,07	12,06 \pm 5,49
B-Bioconser. 1	11,16 \pm 4,44	7,53 \pm 3,43	11,51 \pm 1,52	20,03 \pm 4,91	12,93 \pm 3,63	7,99 \pm 1,77
C-Bioconser. 2	16,61 \pm 4,19	9,25 \pm 2,85	10,92 \pm 1,58	17,21 \pm 6,97	8,86 \pm 0,44	9,73 \pm 3,32
D-Cultivo 1	10,49 \pm 3,59	7,10 \pm 2,44	8,99 \pm 5,80	11,88 \pm 2,23	9,94 \pm 5,46	12,98 \pm 2,03
E-Cultivo 2	14,98 \pm 5,89	10,16 \pm 3,71	9,32 \pm 4,69	14,15 \pm 10,06	7,64 \pm 2,20	8,73 \pm 3,49

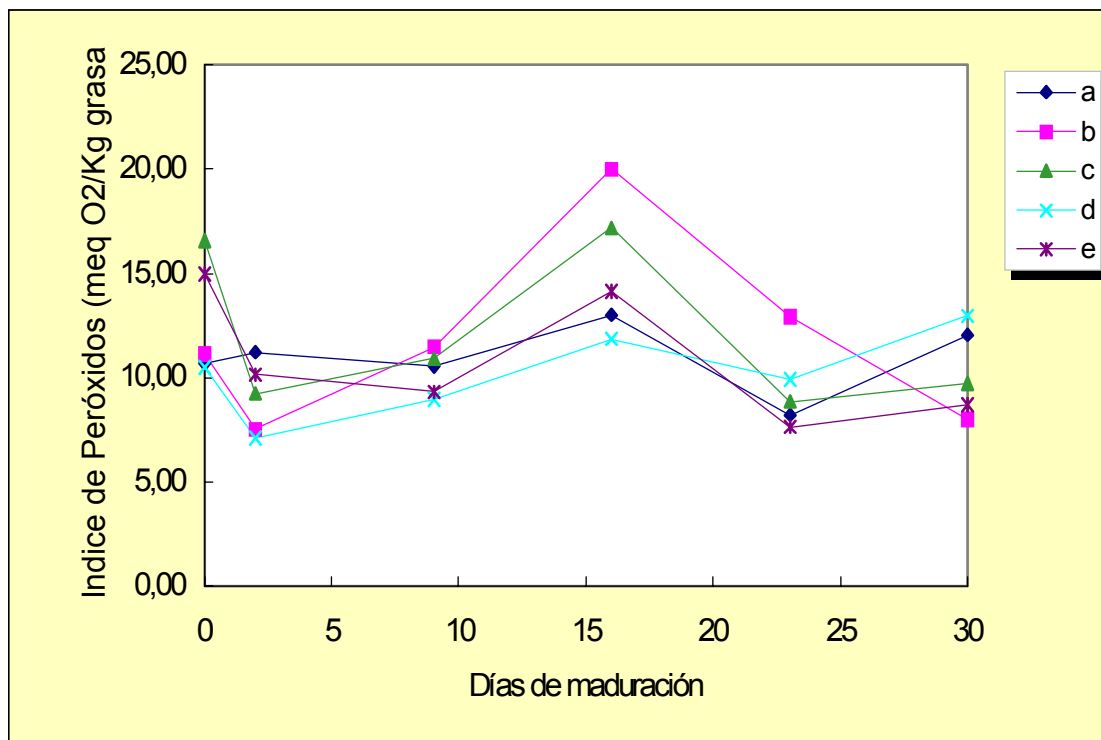


Figura 20. Evolución del índice de peróxidos en los distintos lotes de salchichones durante la maduración.

No obstante, las altas temperaturas a las que son sometidos los embutidos en la etapa de estufaje, próximas a 20°C, incrementan los fenómenos de oxidación y de formación de hidroperóxidos (Kemp, 1957; Flores, 1985), lo cual no coincide con el descenso observado en nuestro estudio. Por otro lado, el índice de peróxidos obtenido en el estufaje, que osciló entre 7,10 y 11,22, es superior al observado por León y Millán (1977) que obtuvieron un valor de 2,34 meq O₂/kg grasa.

El posterior aumento y descenso del índice de peróxidos podría justificarse por la generación de peróxidos que se produce tras el estufaje y la consiguiente transformación de estos en compuestos volátiles. Aunque, como se ha dicho previamente, no se observaron diferencias significativas entre los distintos lotes de embutidos, se puede apreciar que los embutidos inoculados con bioconservadores (lotes B y C) y con el cultivo iniciador tipo 2 (lote E) mostraron al final, valores ligeramente inferiores que el resto.

Los índices de peróxidos obtenidos en el producto final, comprendidos entre 7,99 y 12,98 (meq O₂/kg grasa) coinciden con los observados por otros autores para embutidos de características similares (Chasco *et al.*, 1992a-1992b; Beriain *et al.*, 1993), aunque son ligeramente inferiores a los observados por León y Millán (1977). En otro tipo de embutidos crudos curados, como es el caso del chorizo, el contenido de peróxidos se reduce a cantidades traza ya que la presencia de pimentón en la formulación ejerce un efecto protector, por su naturaleza química carotenoide, frente a la oxidación lipídica (Lizarraga *et al.*, 1989; Melgar *et al.*, 1990; Astiasarán *et al.*, 1990a). Es probable que en el salchichón la presencia de pimienta en la formulación tenga, como ha descrito Berger *et al.* (1990), cierto efecto antioxidante.

Los contenidos finales de peróxidos cuantificados en los salchichones superan los 5 meq O₂/kg grasa que establece Pearson (1968) como límite mínimo

detectable organolépticamente, por tanto, según Demeyer (1974), el sabor final de los embutidos estaría notablemente influenciado por los compuestos químicos resultantes de la modificación de los lípidos. No obstante, la percepción de los productos procedentes de la oxidación lipídica depende en gran medida del umbral de detección de estas moléculas. Algunos investigadores opinan que la aportación al aroma de los productos derivados de la oxidación lipídica es insignificante y que sólo se puede apreciar en ausencia de especias o ahumado, que son los factores que más contribuyen al aroma de los embutidos crudos curados (Domínguez y Zumalacárregui, 1991; Berdagué *et al.*, 1993; Stahnke, 1995b; Mateo y Zumalacárregui, 1996a). Por otro lado, se han llevado a cabo análisis sensoriales relacionados con el olor de los embutidos que han confirmado la importancia de las especias y de los compuestos de oxidación lipídica (Meyner *et al.*, 1998). Los resultados obtenidos con este test de olor han demostrado que la importancia de los compuestos volátiles en el aroma podrían estar más relacionados con su umbral de detección y su naturaleza química que con su concentración. Incluso, algunos olores fueron identificados por los miembros del panel de catadores pero no tuvieron representación en el análisis químico. De esto se puede concluir que las variaciones en el aroma entre distintos tipos de embutidos puede deberse principalmente a las variaciones en la formulación de los ingredientes, sobre todo de las especias.

En el caso del jamón curado, los compuestos volátiles procedentes de la oxidación lipídica son muy similares a los hallados en los embutidos crudos curados, a excepción de los terpenos procedentes de la pimienta negra. La producción de volátiles (aldehídos en particular) durante la maduración del jamón alcanza valores máximos hacia la mitad del proceso y decrece después, mientras que en la segunda mitad de la maduración se produce un incremento de compuestos 3- y 2- metilbutanal (Antequera, 1990; Ventanas *et al.*, 1992; Buscailhon *et al.*, 1993; Hinrichsen y Pedersen, 1995). Aunque la fermentación

bacteriana no se considera un factor determinante en la maduración de los jamones curados, existen indicios de que ciertos microorganismos podrían estar involucrados en la producción de estos compuestos volátiles (Hinrichsen y Pedersen, 1995). La mayor contribución al aroma de los jamones curados se debe a la actuación de las proteinasas y lipasas endógenas del músculo (Antequera, 1990; Córdoba, 1990; Berdagüé *et al.*, 1991; López *et al.*, 1992; Ventanas *et al.*, 1992; Buscailhon *et al.*, 1994b; Hansen-Moller *et al.*, 1997; Virgili *et al.*, 1997).

En cuanto a la contribución de los compuestos procedentes de la oxidación lipídica en el aroma de los jamones curados, Hinrichsen y Pedersen (1995) no encontraron correlación entre los volátiles procedentes de las reacciones de oxidación y el desarrollo del aroma, aunque López *et al.* (1992) asociaron el típico aroma de los jamones ibéricos al efecto combinado de las moléculas volátiles, especialmente productos de la oxidación lipídica. Esta relación también ha sido establecida para jamones curados franceses por Buscailhon *et al.* (1994a), que establece que la lipólisis y la oxidación lipídica juegan un importante papel en la determinación del aroma del jamón curado.

Finalmente, el grado de oxidación de la grasa se ha asociado en ocasiones con procesos de enranciamiento en productos crudos curados, lo cual derivaría en una alteración del producto. Pese a que el índice de peróxidos es una técnica aceptable para detectar la oxidación incipiente de los lípidos presentes en los productos cárnicos no es adecuado para establecer una correlación entre sus valores y el nivel de alteración de la grasa (Melton, 1983).

II. 3. 2. Evolución del índice del ácido tiobarbitúrico (TBA)

Los valores medios y las desviaciones típicas (expresados como mg malonaldehído (MA) /kg de muestra) se muestran en la Tabla 27. La evolución de estos datos a lo largo de la maduración se representa en la Figura 21.

Como puede observarse en la Figura 21, los valores iniciales del índice de TBA, comprendidos entre 0,19 y 0,30 mg MA/kg muestra, sufrieron un incremento paulatino a lo largo de la maduración, que se hizo más acusado a partir del noveno día, hasta alcanzar los valores máximos, que oscilaron entre 0,70 y 0,90 (mg MA/kg muestra) al final de la maduración. Esto supone un aumento de alrededor de 3 veces la concentración inicial de MA. Estos resultados confirman los cambios oxidativos que se producen en los lípidos contenidos en los embutidos crudos curados.

En lo que se refiere a la evolución, se observaron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre las distintas etapas de la maduración, siendo los valores obtenidos en la segunda, tercera y cuarta semana de maduración, significativamente más elevados que los obtenidos en el amasado, estufaje y primera semana ($p < 0,001$). La evolución del índice de TBA observado en este estudio fue similar al encontrado por Chasco *et al.* (1993) en salchichones, donde partiendo de valores iniciales de 0,16 mg MA obtiene al final de la maduración una concentración de 0,41 mg MA. Asimismo, Kenneally *et al.* (1998a) obtuvieron a los 35 días de maduración los máximos valores en el índice de TBA que oscilaron entre 1,5 y 3,5 mg MA. Nuestros lotes son ligeramente inferiores a los que obtuvieron Beriain *et al.* (1993) en salchichones. Si comparamos con otros productos cárnicos crudos curados, como el salami, la curva de evolución del índice de TBA en la maduración es similar al encontrado para salchichones, aunque los valores finales son ligeramente más elevados (Chasco *et al.*, 1992b; Chasco *et al.*, 1993). En cuanto al chorizo, Melgar *et al.* (1990) observaron pequeñas variaciones en el valor de TBA durante la maduración y lo atribuyeron a la presencia de sustancias antioxidantes como el pimentón.

Tabla 27. Índice de TBA (media \pm desviación típica) en los diferentes lotes de salchichones analizados en las distintas etapas del proceso de elaboración (expresado en mg MA/kg muestra).

Lotes	Amasado	Estufaje	Secado			
			1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
A-Control	0,28 \pm 0,12	0,34 \pm 0,15	0,44 \pm 0,21	0,68 \pm 0,38	0,76 \pm 0,49	0,78 \pm 0,67
B-Bioconser. 1	0,30 \pm 0,17	0,36 \pm 0,23	0,50 \pm 0,36	0,67 \pm 0,53	0,83 \pm 0,71	0,90 \pm 0,76
C-Bioconser. 2	0,19 \pm 0,02	0,24 \pm 0,04	0,32 \pm 0,06	0,49 \pm 0,08	0,64 \pm 0,09	0,70 \pm 0,10
D-Cultivo 1	0,25 \pm 0,05	0,35 \pm 0,13	0,49 \pm 0,30	0,61 \pm 0,45	0,76 \pm 0,55	0,90 \pm 0,66
E-Cultivo 2	0,29 \pm 0,14	0,34 \pm 0,18	0,50 \pm 0,34	0,73 \pm 0,47	0,79 \pm 0,58	0,88 \pm 0,81

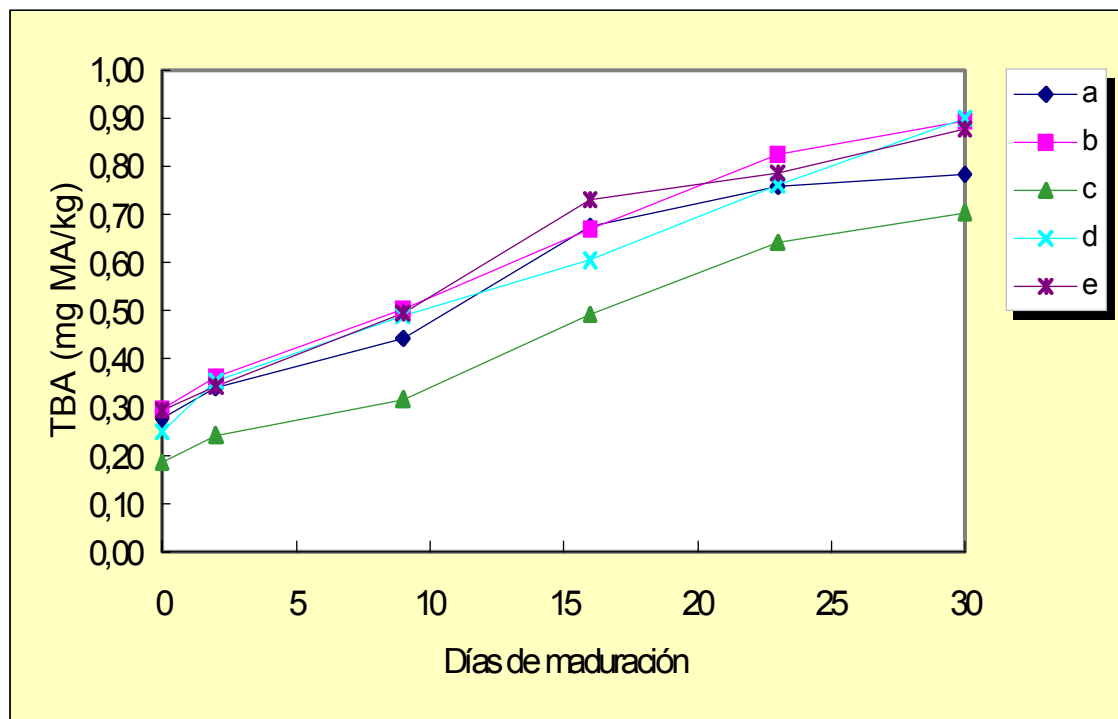


Figura 21. Evolución del índice del TBA en los salchichones analizados durante el proceso de maduración.

De la misma forma, se ha descrito para productos cárnicos cocidos una actividad de los nitritos que reduce la oxidación lipídica valorada según el índice de TBA (Shahidi *et al.*, 1987); posteriormente Fereidoon *et al.* (1988) comprobaron que el nitrito de sodio podía disminuir el incremento del valor de TBA. Kuo *et al.* (1986) también apuntaron que con la adición de mayor cantidad de nitrito sódico en la formulación de embutidos crudos curados, el valor del índice de TBA obtenido era más bajo. Esto es debido a que el nitrito sódico actúa como antioxidante y como agente quelante, uniéndose a los metales pesados para prevenir la oxidación de las grasa (Ockerman, 1972; Hadden *et al.*, 1975; Macdonald *et al.*, 1980). Un efecto similar al del nitrito se ha comprobado para la acción sinérgica de ciertas cantidades de ascorbato y tripolifosfato sódico cuando actúan juntos (Yun *et al.*, 1987). En nuestro caso también se ha observado una correlación inversa entre el contenido de nitritos y el índice de TBA ($r = 0,6619$; $p < 0,001$).

Aunque, como se ha mencionado previamente, el número de TBA, que evalúa la cantidad de MA formado durante la oxidación de los ácidos grasos insaturados, es el índice más aceptable para evaluar la oxidación lipídica (Igene *et al.*, 1985; Gray y Pearson, 1987) se ha comprobado que el MA no es el único reactivo que reacciona con el ácido 2-tiobarbitúrico (Marcuse y Johansson, 1973; Raharjo *et al.* 1993), por lo que este índice debe ser interpretado como el total de sustancias reactivas al TBA. Los resultados relativos a la oxidación pueden ser más altos que los reales debido a la probable formación de MA durante el análisis de hidroperóxidos residuales. Esto también podría explicar las ligeras diferencias entre los seis tipos de embutidos analizados en nuestro estudio.

Por otro lado, el valor de TBA también está influenciado por el metabolismo microbiano, se considera que la oxidación y enranciamiento de las grasas se debe en parte a la actividad de lactobacilos y micrococos (Demeyer *et al.*, 1974; Reddy, 1975). Darmadji *et al.* (1990) y Marangkey *et al.* (1989)

apuntaron que las bacterias ácido lácticas inoculadas a embutidos fermentados podrían disminuir el índice de TBA. No obstante, se ha comprobado que en embutidos inoculados con *Staphylococcus xylosus* y *Staphylococcus carnosus*, al final de la maduración, se obtienen mayores concentraciones de aldehídos y cetonas (Montel *et al.*, 1997). De la misma forma, en experiencias con cultivos iniciadores mixtos de bacterias lácticas y micrococáceas (*Lactobacillus sake* + *Staphylococcus carnosus*) se obtuvieron mayores concentraciones de estos compuestos volátiles. En nuestro caso, la inoculación de cultivos iniciadores mixtos a los embutidos (lotes D y E) ha proporcionado un ligero incremento del valor de TBA frente a los lotes A y C; aunque Huang y Lin (1995) no observaron ningún efecto de los cultivos iniciadores sobre el valor de TBA en embutidos crudos curados.

Se ha observado una correlación positiva entre el índice de TBA y los recuentos de estafilococos y micrococos, con coeficientes de correlación de $r = 0,6901$ y $r = 0,7377$ ($p < 0,001$), respectivamente. Además se ha comprobado que los mayores recuentos de estos microorganismos en el embutido se corresponden con los mayores valores en el índice de TBA.

Los procesos oxidativos en embutidos crudos curados también se ven afectados por la a_w (Nawar, 1995). La reducción de la a_w provoca la formación de compuestos con actividad antioxidante e impide el acceso del oxígeno al alimento, de forma que reduce la oxidación de la grasa. Esto se ha puesto de manifiesto en nuestro estudio, donde se ha determinado una correlación inversa altamente significativa entre la a_w y el índice de TBA ($r = - 0,9589$; $p < 0,001$). En este caso también se ha comprobado que los valores más bajos de a_w se corresponden con los mayores en el índice de TBA (lotes D y E).

III. 4. EVOLUCION DE LOS RECUEENTOS MICROBIOLOGICOS

III. 4. 1. Recuento total

En la Tabla 28 se muestran los valores medios y las desviaciones típicas de los recuentos de bacterias aerobias mesófilas (expresado como log ufc/g) de los distintos lotes de embutidos analizados a lo largo de la maduración. La evolución de dichos recuentos se representa esquemáticamente en la Figura 22. Como puede apreciarse la evolución es similar para todos los lotes de salchichones. Durante el estufaje se produce un considerable incremento de los valores iniciales que ó bien se mantienen constantes durante el resto de la maduración ó bien descienden ligeramente en los últimos estadíos.

Partiendo de valores iniciales de bacterias aerobias mesófilas comprendidos entre 6,66 y 7,44 log ufc/g, tras el estufaje se produce un incremento de los recuentos que varía dependiendo del lote. Los salchichones inoculados con el cultivo iniciador comercial 1 (lote D) experimentaron un aumento de casi el 30 %, alcanzando recuentos de 8,74 log ufc/g. Recuentos similares mostraron los salchichones inoculados con el cultivo iniciador 2 (lote E), que con un incremento de los valores iniciales del 22,3 % alcanzaron un valor de 8,88 log ufc/g. Estos recuentos fueron los máximos obtenidos tras el estufaje.

Durante las dos primeras semanas de maduración el recuento total de los embutidos del lote D siguió aumentando ligeramente hasta alcanzar un máximo el día 16 con un valor de 9,07 log ufc/g, el cual volvió a descender en los siguientes días hasta un valor final de 8,93 log ufc/g. Los embutidos del lote E, en cambio, mantuvieron constante el valor alcanzando en el estufaje durante las dos primeras semanas de maduración, y se incrementó ligeramente al final, alcanzando un valor de 9,09 log ufc/g.

Tabla 28. Valores medios (log ufc/g muestra) y desviaciones típicas de los recuentos de bacterias aerobias mesófilas en los diferentes lotes de salchichones analizados en las distintas etapas del proceso de elaboración.

Lotes	Amasado	Estufaje	Secado	Secado	Secado	Secado
			1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
A-Control	6,66±0,09	7,58±0,17	7,96±0,32	8,20±0,33	8,11±0,46	8,02±0,50
B-Bioconser. 1	7,44±0,25	8,50±0,07	8,79±0,14	8,60±0,08	8,58±0,78	8,50±0,56
C-Bioconser. 2	6,66±0,20	8,25±0,14	8,36±0,15	8,50±0,07	8,19±0,10	8,13±0,05
D-Cultivo 1	6,73±0,07	8,74±0,11	9,00±0,24	9,07±0,42	8,80±0,41	8,93±0,54
E-Cultivo 2	7,26±0,26	8,88±0,40	8,79±0,22	8,80±0,27	8,96±0,48	9,09±0,36

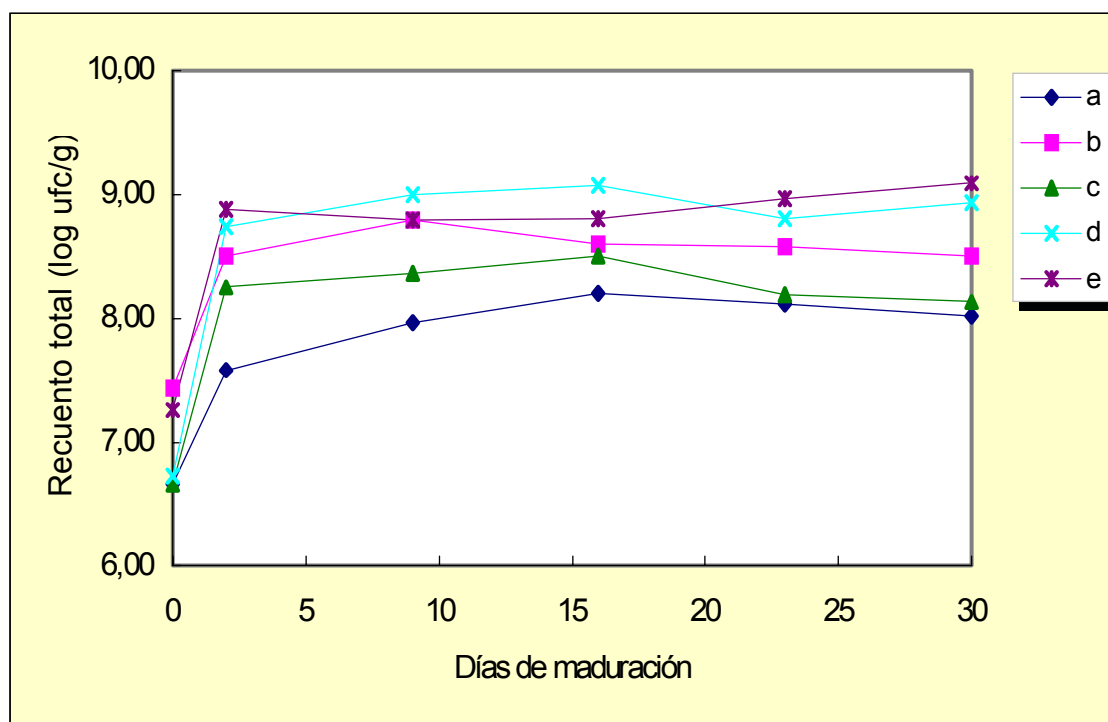


Figura 22. Evolución de los recuentos de bacterias aerobias mesófilas en los salchichones durante el proceso de maduración.

Los salchichones inoculados con los bioconservadores (lotes B y C) tuvieron un comportamiento desigual, mientras que el lote B experimentó un incremento del 14,2 % en el estufaje, el lote C, en cambio, mostró el segundo mayor incremento, el 23,8 %, que le llevó a alcanzar valores de 8,25 log ufc/g. Los valores obtenidos tras el estufaje para los lotes B y C, 8,50 y 8,25 log ufc/g respectivamente, se incrementaron ligeramente en las dos siguientes semanas de maduración, para descender en las dos últimas, obteniéndose al final valores de 8,50 log ufc/g para el lote B y 8,13 log ufc/g para el lote C. Los máximos valores alcanzados fueron de 8,79 para el lote B que se determinó el día 9 y 8,50 para el lote C, determinado el día 16. Finalmente los embutidos sin inocular (lote A) experimentaron el menor incremento de todos los lotes durante el estufaje, sólo un 13,8 % que le permitió obtener un recuento de 7,58 log ufc/g. Este valor continuó aumentando hasta alcanzar el valor máximo en el día 16 (8,20 log ufc/g) y descendió hasta 8,02 log ufc/g en la última etapa de la maduración.

En el análisis estadístico se ha observado que los embutidos inoculados con el bioconservador tipo 1 (lote B) y con los cultivos iniciadores comerciales (lotes D y E) mostraron recuentos microbianos significativamente más elevados que el resto de embutidos ($p < 0,001$). Asimismo, se han obtenido diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los recuentos en la fase de amasado (día 0) y las demás etapas del proceso, siendo los valores iniciales más bajos que el resto.

Los recuentos totales, observados en el día 0 (amasado) en los distintos lotes de embutidos están dentro del rango definido por Gill y Newton (1977) para flora inicial de embutidos crudos curados establecido entre 5,7-8,9 log ufc/g y con un valor medio de 6 log ufc/g. Estos datos también coinciden con los observados por otros autores (Selgas *et al.*, 1988; Samelis *et al.*, 1993-1994; Papa *et al.*, 1995; Molly *et al.*, 1996). Aunque en nuestro estudio no se apreciaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los recuentos iniciales de los distintos lotes de embutidos analizados, otros investigadores obtuvieron mayores

diferencias entre los recuentos iniciales en embutidos inoculados con cultivos iniciadores de bacterias lácticas que en los que no contenían cultivos. Así, Sanz *et al.* (1997a) obtuvieron un valor medio inicial de 3,92 log ufc/g en los lotes sin inocular frente a los inoculados que presentaron valores de 6,84 log ufc/g. También García *et al.* (1992) observaron que los embutidos sin inocular presentaron recuentos de 2 log ufc/g en el día 0 frente a 6 log ufc/g que obtuvieron en los embutidos inoculados con distintos tipos de cultivos iniciadores. Finalmente, Hierro *et al.* (1997) también comprobaron que mientras el lote control solo presentaba un recuento total de 3 log ufc/g los lotes inoculados con un cultivo mixto de lactobacilos y micrococos presentaron valores de 6,5-7 log ufc/g. Estas diferencias pueden ser debidas a la tecnología de fabricación empleada, concretamente al tiempo que permanece la masa cárnica en reposo antes del embutido.

En cuanto a la evolución durante el estufaje, distintos autores coinciden en señalar que se produce un incremento considerable de la flora inicial hasta valores próximos a 10^8 ufc/g (Palumbo y Smith, 1977; Liepe, 1982; Lücke, 1984; Sanz *et al.*, 1988 y Selgas *et al.*, 1988). En embutidos madurados naturalmente, sin adición de aditivos lácticos, Samelis *et al.* (1994) señalaron que durante el estufaje se producía un incremento del recuento total del 14 %, hasta valores de 7,32-7,77 log ufc/g. Sin embargo, en otros trabajos se han determinado en el estufaje menores recuentos en embutidos sin cultivos iniciadores que en los que los contenían (Sanz *et al.*, 1997a; García *et al.*, 1992; Hierro *et al.*, 1997). Estas diferencias en los recuentos también se observaron en nuestro estudio, estableciéndose una diferencia de casi una unidad logarítmica entre los recuentos de los lotes D y E y los recuentos del lote A. 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 9 y 16 de maduración, para luego descender ligeramente, excepto en los embutidos inoculados con el cultivo iniciador 2 (lote E), donde el máximo valor se determinó el día 30 de maduración. En general, en la mayoría de los trabajos consultados los valores máximos se alcanzan tras el estufaje, y a partir de ese momento, ó bien descienden ligeramente (Bello *et al.*, 1974; Samelis *et al.*, 1994; Ordóñez *et al.*, 1995; Sanz *et al.*, 1997a) ó bien permanecen constantes hasta el final del proceso (Samelis *et al.*, 1993; Papa *et al.*, 1995; Hierro *et al.*, 1997).

III. 4. 2. Flora láctica

El recuento de flora láctica se realizó mediante siembra en agar MRS, a partir del cual se aislaron las colonias sobre las que se realizaron las pruebas de identificación descritas en el apartado II.2.2.3. para la diferenciación hasta nivel de género. Todas las colonias aisladas fueron bacilos Gram positivos, productores de gas y capaces de hidrolizar la arginina, aunque no se detectó la producción de acetoina. La identificación llevada a cabo demostró que todas ellas pertenecían al género *Lactobacillus*. Estos resultados coinciden con los observados por otros autores, que comprobaron que los lactobacilos constituyen la flora mayoritaria de los embutidos crudos curados (Palumbo *et al.*, 1976; Lücke, 1987; Samelis *et al.*, 1993; Ordóñez *et al.*, 1995; Sanz *et al.*, 1997a).

Los recuentos medios de lactobacilos (expresados como log ufc/g) y las desviaciones típicas de los diferentes lotes de embutidos analizados se muestran en la Tabla 29. Asimismo, la evolución de los recuentos a lo largo de la maduración se representa en la Figura 23.

Como se puede observar en la Tabla 29, los recuentos iniciales fueron más elevados en los embutidos inoculados con cultivos iniciadores, que mostraron valores de 6,32 y 6,57 para los lotes D y E, respectivamente. Estos recuentos fueron casi dos unidades logarítmicas más elevados que los determinados en los embutidos sin inocular (lote A) donde se determinó un valor de 4,53 log ufc/g. Los salchichones inoculados con bioconservadores mostraron valores intermedios, con recuentos de 5,29 para los embutidos del lote B y de 5,78 para los del lote C. Estas diferencias pueden atribuirse a la adición de células viables que se realiza cuando se utilizan cultivos iniciadores. Numerosos investigadores han comprobado que la adición de cultivos iniciadores incrementa los recuentos iniciales de bacterias lácticas (García *et al.*, 1992; Montel *et al.*, 1993; Stahnke, 1995a; Huang y Lin, 1995; Sanz *et al.*, 1997a). En el caso de los bioconservadores no se observa un incremento considerable, ya que estos no aportan células viables a la masa cárnica, puesto que como se ha definido anteriormente estos productos consisten en una mezcla de metabolitos procedentes del crecimiento de un cultivo de bacterias lácticas.

Durante el estufaje los embutidos de los lotes D y E experimentaron un aumento de los recuentos de casi el 40 %, que les llevó a obtener valores de 8,90 y 8,95 log ufc/g, respectivamente. Estos recuentos permanecieron prácticamente constantes durante la primera semana de maduración y a partir de la segunda comenzaron a descender ligeramente, hasta el final del proceso donde se determinaron recuentos de 8,37 y 8,33 log ufc/g. Los embutidos inoculados con bioconservadores, durante el estufaje, sufrieron un incremento del número de lactobacilos del 59 % para el lote B y del 39 % para el lote C, obteniendo valores en esta etapa de 8,40 y 8,01 log ufc/c, respectivamente. Estos recuentos experimentaron ligeras oscilaciones en el transcurso de las cuatro semanas de maduración para al final mostrar unos valores de 8,49 (lote B) y 7,93 (lote C) log ufc/g.

Tabla 29. Valores medios (log ufc/g muestra) y desviaciones típicas de los recuentos de lactobacilos en los diferentes lotes de salchichones analizados en las distintas etapas del proceso de elaboración.

Lotes	Amasado	Estufaje	Secado			
			1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
A-Control	4,53±0,17	7,29±0,98	7,72±0,54	8,13±0,61	7,45±1,54	7,34±0,84
B-Bioconser. 1	5,29±0,38	8,40±0,14	8,59±0,08	8,05±1,07	8,32±0,18	8,49±0,20
C-Bioconser. 2	5,78±0,76	8,01±0,44	7,92±0,48	7,81±0,58	8,16±0,34	7,93±0,53
D-Cultivo 1	6,32±0,22	8,90±0,12	8,92±0,31	8,65±0,11	8,61±0,34	8,37±0,23
E-Cultivo 2	6,57±0,33	8,95±0,28	9,01±0,27	8,54±0,24	8,66±0,11	8,33±0,32

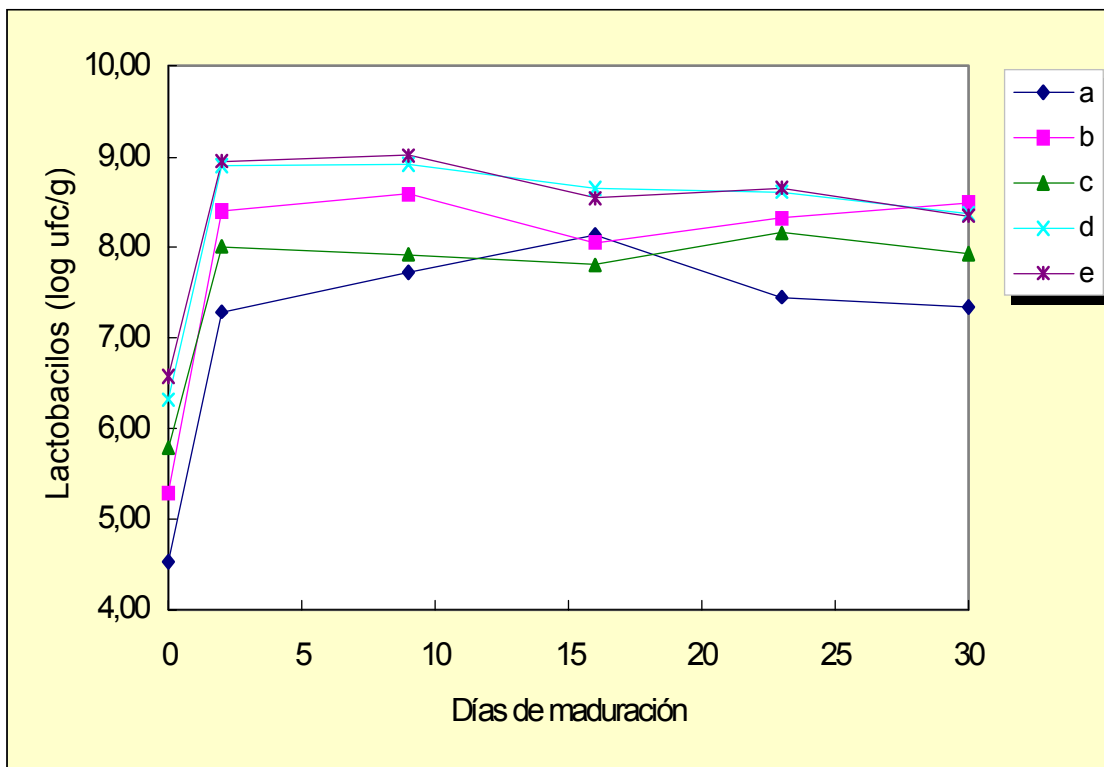


Figura 23. Evolución de los recuentos de lactobacilos en los distintos lotes de salchichones durante el proceso de maduración.

Por otro lado, los salchichones del lote A mostraron durante el estufaje el máximo incremento (61%) en los recuentos de lactobacilos, que les llevó a alcanzar un valor de 7,34 log ufc/g. Estos recuentos experimentaron un ligero ascenso hasta un valor de 8,13 log ufc/g que se determinó en la segunda semana de maduración. Posteriormente, los recuentos descendieron nuevamente durante las dos últimas semanas. Al final se determinó un valor de 7,34 log ufc/g que fue el mínimo que se obtuvo para todos los lotes, frente a los de los lotes B y D que fueron los máximos.

Las diferencias observadas entre los embutidos inoculados con cultivos iniciadores (lotes D y E) y el resto de lotes fueron estadísticamente significativas ($p < 0,001$), mostrando los primeros los recuentos de lactobacilos más elevados. No obstante no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los recuentos del lote D y E entre sí. Por otro lado, los salchichones sin inocular (lote A) mostraron los recuentos de lactobacilos más bajos, estableciéndose también diferencias significativas con el resto de lotes ($p < 0,001$). En cuanto a los embutidos inoculados con bioconservadores tampoco se determinaron diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$), aunque sí existieron diferencias con el resto de lotes ($p < 0,001$). Con respecto a la evolución, se ha comprobado que los recuentos obtenidos durante la etapa de amasado (día cero) para todos los lotes fueron significativamente menores ($p < 0,001$) que los observados en el resto de etapas, entre las cuales no se determinaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

La evolución en los recuentos de lactobacilos observados para los embutidos sin inocular (lote A) es similar a la observada por Samelis *et al.* (1994) en embutidos fermentados naturalmente (sin cultivos iniciadores). En este estudio, se constata un importante incremento de los recuentos tras el estufaje que se mantiene durante las dos primeras semanas de maduración para luego decrecer en las dos siguientes. El predominio de los lactobacilos en embutidos crudos curados a los que no se ha adicionado cultivos iniciadores ha sido

previamente descrita por numerosos autores (Smith y Palumbo, 1973; Palumbo *et al.*, 1976; Sanz *et al.*, 1988; Selgas *et al.*, 1988). Este predominio confirma el hecho de que bajo unas condiciones de maduración adecuadas y con unas Buenas Practicas de Fabricación (BPF) se pueden producir embutidos de excelente calidad sin la adición de cultivos iniciadores (Lücke, 1987; Jessen, 1995).

No obstante, Lücke (1994) afirma que la adición de bacterias lácticas, como cultivos iniciadores, acorta considerablemente la fase exponencial de crecimiento microbiano que se produce durante la fase de estufaje, de forma que las bacterias ácido lácticas se instauran como flora predominante antes que en el caso de que no se utilicen cultivos iniciadores.

En nuestro estudio los embutidos inoculados con cultivos iniciadores comerciales (lotes D y E) obtuvieron los recuentos más elevados tras el estufaje, próximos a 9 log ufc/g mientras que el resto de lotes no excedió el valor de 8 log ufc/g, excepto en el lote B. Además los embutidos de los lotes D y E alcanzaron los recuentos máximos en el estufaje, en tanto que los otros embutidos no lo consiguieron hasta la segunda o tercera semana. Hierro *et al.* (1997), en un estudio con embutidos inoculados de un cultivo mixto de *Lactobacillus plantarum* y *Staphylococcus* spp., obtuvieron inicialmente recuentos próximos a 7 log ufc/g que se elevaron tras el estufaje a 8,5 para mantenerse hasta el final del proceso. Recuentos similares fueron determinados por Montel *et al.* (1993) en embutidos inoculados con *Lactobacillus sake* y *Staphylococcus carnosus*, y por García *et al.* (1992) en salchichones inoculados con *Lactobacillus* spp. y *Micrococcus* spp.

No obstante, Sanz *et al.* (1997a), en embutidos inoculados con *Lactobacillus sake* y *Staphylococcus carnosus*, partiendo de valores iniciales de 6,2 log ufc/g, observaron que tras el estufaje los recuentos no superaron 7,53 log ufc/g, muy similares a los que determinaron en los embutidos sin inocular. Algo

similar fue observado por Garriga *et al.* (1996), que en un ensayo con 5 cepas distintas de *Lactobacillus sake* inoculados en embutidos, comprobaron que la respuesta del microorganismo inoculado era muy similar a la de los embutidos sin inocular, incluso en dos de las cepas ensayadas, el cultivo iniciador no fue capaz de dirigir la fermentación y no se instauró como microorganismo predominante.

Finalmente, en los embutidos inoculados con bioconservadores el crecimiento de los lactobacilos fue intermedio, es decir, aunque no llegó a los niveles que se determinaron con la adición de los cultivos iniciadores, si superaron los recuentos de los embutidos sin inocular. De los dos bioconservadores utilizados fue el empleado en el lote B el que mostró los mayores recuentos tras el estufaje. Es probable que la adición de estas sustancias estimule el crecimiento de la flora láctica presente en la masa cárnica, acortando la fase de latencia de estos microorganismos.

Se ha observado una correlación positiva altamente significativa ($r = 0,9133$; $p < 0,001$) entre los recuentos de lactobacilos y los de bacterias aerobias mesófilas. Como se puede observar en las Tablas 28 y 29, los recuentos de aerobias mesófilas fueron muy similares a los de lactobacilos. Muchos autores coinciden en señalar que los recuentos de flora microbiana total están determinados en gran parte por el número de lactobacilos presentes, y que suelen coincidir los recuentos totales con los de la flora láctica (Selgas *et al.*, 1988; Samelis *et al.*, 1994; Hierro *et al.*, 1997).

Se ha establecido una correlación negativa entre el pH y el recuento de lactobacilos ($r = - 0,8194$; $p < 0,001$). Tras el estufaje se alcanzaron los máximos recuentos de lactobacilos y esto coincide con un importante descenso del pH, que fue más acusado en los embutidos inoculados con los cultivos comerciales. Asimismo, es interesante destacar la correlación existente entre el recuento de

lactobacilos y el contenido de ácido láctico ($r = 0,8046$; $p < 0,001$). Se ha comprobado que los mayores recuentos de lactobacilos coinciden con las mayores concentraciones de ácido láctico y a su vez con los menores valores de pH (Tablas 14 y 15).

El predominio de la flora láctica es debido en gran parte a que los lactobacilos están bien adaptados a las condiciones de acidez, presencia de NaCl y anaerobiosis que imperan en el embutido crudo curado, por lo que pueden persistir mucho tiempo (Cantoni, 1966). En cambio la flora Gram negativa (enterobacterias y coliformes) se ve muy afectada por las condiciones de pH ácido y a_w baja, por lo que son inhibidas en favor de la flora láctica. Además las bacterias lácticas producen ácidos orgánicos y bacteriocinas que previenen el crecimiento de microorganismos indeseables. Algunos investigadores ya defendieron esta teoría y demostraron que la inhibición de las bacterias Gram negativas por las bacterias lácticas era posible debido a la producción de factores de inhibición o sustancias con efecto antibiótico (Reddy *et al.*, 1970). Bacus (1986) describió cómo la rápida descomposición de los azúcares por las bacterias lácticas originaba un fuerte descenso del pH que inhibía el crecimiento de microorganismos alterantes. En nuestro estudio se pone de manifiesto una correlación negativa entre los recuentos de lactobacilos y los recuentos de enterobacterias ($r = - 0,6836$; $p < 0,001$) y de coliformes ($r = - 0,7838$; $p < 0,001$). Además se ha podido comprobar que los menores recuentos de estos microorganismos alterantes coinciden con los mayores recuentos de lactobacilos (Tablas 32, 33 y 29).

III. 4. 3. Micrococos

En la Tabla 30 se muestran los valores medios (expresados como log ufc/g) y las desviaciones típicas de los recuentos de micrococáceas de los salchichones analizados. La representación gráfica de estos datos aparece en la

Figura 24, que recoge la evolución de los recuentos a lo largo de la maduración. Como se observa en la Tabla 30, los recuentos iniciales oscilaron entre 4,34 y 6,20 log ufc/g. Los valores más elevados correspondieron a los embutidos inoculados con cultivos iniciadores comerciales (lotes D y E), los cuales contenían células de *Staphylococcus xylosus* y *Staphylococcus carnosus*. Durante el estufaje, los recuentos en estos embutidos descendieron ligeramente, siendo este descenso más acusado para el lote E, que quedó con un valor de 5,44 log ufc/g lo que supuso una disminución del 12 %, frente a la determinada para el lote D, que fue sólo del 7 %.

En la primera semana de maduración los valores volvieron a incrementarse. También en este caso el incremento fue más acusado en los embutidos del lote E, que alcanzaron el máximo valor (6,86 log ufc/g) con un aumento de casi 1,5 unidades logarítmicas sobre los recuentos determinados en el estufaje. El lote D mostró un incremento más ligero, sólo 0,5 unidades logarítmicas, hasta alcanzar un valor de 6,36 log ufc/g.

Durante las restantes semanas de maduración los embutidos del lote D aumentaron ligeramente hasta los 30 días, donde mostraron el máximo valor de 7,04 log ufc/g. En cambio el lote E descendió ligeramente en la segunda semana para aumentar en la tercera y mantenerse constante hasta el final del proceso, donde se determinó un valor de 6,81 log ufc/g. Pese a que no se hallaron diferencias entre ambos lotes ($p > 0,05$), los recuentos ligeramente más elevados observados en el lote D se pueden explicar por el mayor contenido de células viables de micrococáceas que contenía el cultivo iniciador 1, un 66 % frente al 50 % que presentaba el del lote E.

Los embutidos inoculados con bioconservadores, lotes B y C, mostraron unos valores medios en el amasado de 5,85 y 5,28 log ufc/g, respectivamente. Estos valores se mantuvieron constantes durante el estufaje, y en el caso de los

Tabla 30. Valores medios (log ufc/g muestra) y desviaciones típicas de los recuentos de micrococos en los diferentes lotes de salchichones analizados en las distintas etapas del proceso de elaboración.

Lotes	Amasado	Estufaje	Secado			
			1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
A-Control	4,34±0,12	5,86±0,75	6,55±0,63	6,76±0,63	6,75±0,70	6,52±0,49
B-Bioconser. 1	5,85±0,80	5,82±0,39	5,80±0,41	6,53±0,61	6,72±0,44	6,49±0,90
C-Bioconser. 2	5,28±0,32	5,28±0,37	5,96±0,12	6,17±0,65	6,14±0,69	6,36±0,62
D-Cultivo 1	6,20±0,59	5,79±0,32	6,23±0,41	6,85±0,65	6,88±0,94	7,04±0,33
E-Cultivo 2	6,16±0,59	5,44±0,66	6,86±0,94	6,53±1,12	6,81±0,87	6,81±0,52

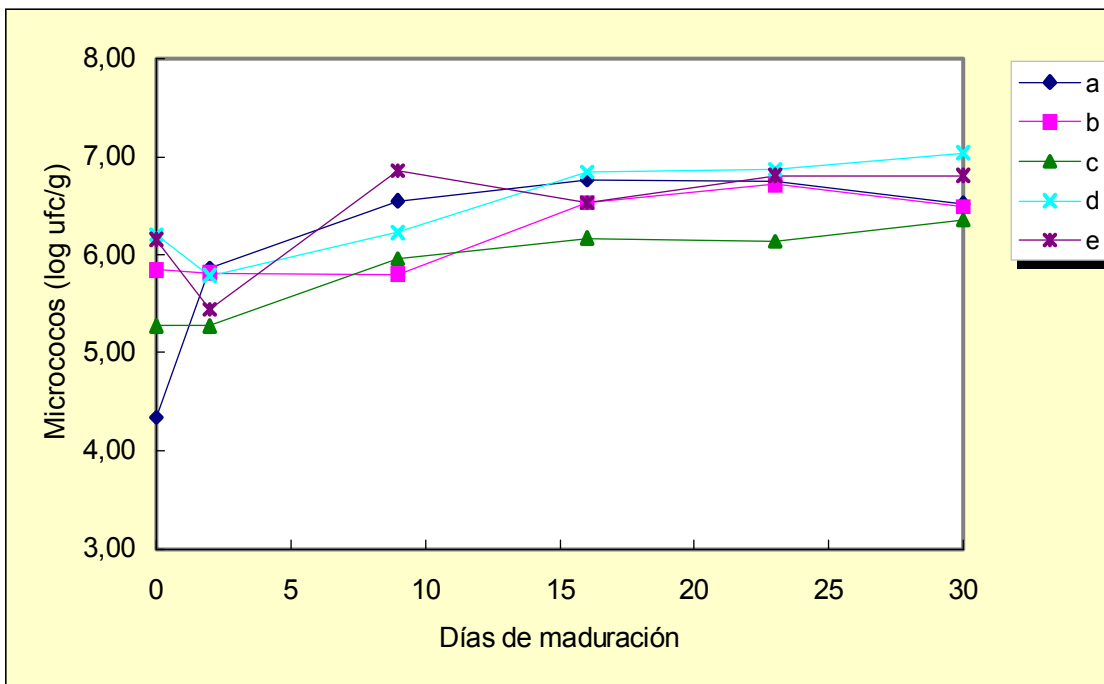


Figura 24. Evolución de los recuentos de micrococos en los distintos lotes de salchichones durante el proceso de maduración.

embutidos del lote B también durante la primera semana. Los salchichones inoculados con el bioconservador 2 (lote C) vieron incrementados los recuentos de micrococáceas ligeramente durante la primera semana de maduración hasta un valor de 5,96 log ufc/g y continuaron incrementando hasta el final del proceso, en que mostraron el máximo valor con un recuento de 6,36 log ufc/g. Los embutidos del lote B también incrementaron sus recuentos durante la segunda y tercera semana de maduración hasta alcanzar un valor máximo de 6,71 log ufc/g y descendieron ligeramente hasta 6,49 log ufc/g al final del proceso.

Finalmente, los recuentos iniciales más bajos, 4,34 log ufc/g, fueron determinados en los embutidos sin inocular (lote A). Estos recuentos sufrieron un fuerte incremento durante el estufaje, más de 1,5 unidades logarítmicas, hasta un valor de 5,86 log ufc/g que continuó aumentando durante las dos siguientes semanas hasta alcanzar un máximo de 6,76 log ufc/g, que se mantuvo en la tercera semana y descendió ligeramente en la cuarta.

En el análisis estadístico se determinó que en los embutidos inoculados con los cultivos iniciadores, lotes D y E, los recuentos de micrococáceas fueron significativamente más altos ($p < 0,001$) que los hallados en el lote C (bioconservador tipo 2). No obstante no se hallaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los recuentos de los lotes D y E con los lotes A y B. En cuanto a la evolución del proceso, como puede apreciarse en la Figura 24, los recuentos hallados en el amasado y estufaje fueron significativamente más bajos ($p < 0,001$) que los determinados en el resto de etapas.

Inicialmente los recuentos de micrococáceas son parecidos a los de lactobacilos, esto ha sido confirmado previamente por otros autores (Reuter *et al.*, 1968, DeKetelaere *et al.*, 1974; Sanz *et al.*, 1988; Selgas *et al.*, 1988; Domínguez *et al.*, 1989; Hierro *et al.*, 1997). Además, es probable que las

micrococáceas puedan contribuir a completar la oxidación de los hidratos de carbono a cargo de los lactobacilos (DeKetelaere, *et al.*, 1974).

Los recuentos medios determinados en este trabajo, en torno a 10^6 ufc/g de micrococáceas, son similares a los obtenidos por otros autores en embutidos de características similares (Sanz *et al.*, 1988; Selgas *et al.*, 1988; Domínguez *et al.*, 1989; Montel *et al.*, 1993; Samelis *et al.*, 1993; Bello y Sanchez-Fuertes, 1995; Ibáñez *et al.*, 1996). No obstante, estos recuentos son más elevados que los determinados por Lücke (1987) que obtuvo valores medios próximos a 10^4 ufc/g hasta el final de la maduración; y más bajos que los obtenidos por Samelis *et al.* (1993, 1994) para embutidos fermentados naturalmente, donde se determinaron recuentos medios en torno a 10^7 - 10^8 ufc/g.

La mayoría de los autores coinciden en señalar que durante los primeros días de maduración se produce una multiplicación precoz de los cocos Gram positivos que lleva a obtener los recuentos máximos tras el estufaje (Pozo, 1985; Sanz *et al.*, 1988; Samelis *et al.*, 1994; Bello y Sánchez-Fuertes, 1995; Hierro *et al.*, 1997). No obstante otros autores observan un ligero descenso de los recuentos, aunque los valores se estabilizan en las siguientes semanas (García *et al.*, 1992; Ibáñez *et al.*, 1996; Kenneally *et al.* 1998b).

Las micrococáceas son sensibles a los medios ácidos y las condiciones que se establecen tras el estufaje en los embutidos fermentados son digenésicas para estos microorganismos. Distintos autores afirman que, cuando el pH comienza a descender, se produce un relevo de los micrococos por los lactobacilos como consecuencia de la acumulación de ácido láctico en el medio (Rozier, 1969; Klettner y Baumgartner, 1980; Coventry y Hickey, 1991). Sin embargo, en la mayoría de los estudios realizados no se confirma esta disminución de los recuentos de micrococáceas durante la maduración. La explicación a este hecho podría ser que el medio de cultivo MSA (Manitol Sal Agar) para micrococáceas

no es totalmente selectivo. Se ha comprobado que durante los últimos estadios de la maduración, las colonias que crecen en este medio no pertenecen a la familia *Micrococcaceae* sino que son bacilos Gram positivos, catalasa positivos (Smith y Palumbo, 1973; Palumbo *et al.*, 1976; Sanz *et al.*, 1988). Además Selgas *et al.* (1988) determinaron que la máxima identificación de micrococáceas se realizaba después de 7-15 días de maduración, y a partir de los 20-25 días todas las colonias aisladas eran bacilos Gram positivos, catalasa positivos. Previamente, Selgas *et al.* (1986) habían aconsejado la verificación de los tipos de colonias que crecen en el agar selectivo para micrococos y no confiar sólo en la supuesta especificidad del medio.

Por otro lado, Samelis *et al.* (1994) en un estudio de identificación de las micrococáceas de embutidos fermentados naturalmente, afirma que el 80 % de las colonias aisladas en el medio MSA fueron estafilococos y asegura que los micrococos sólo se detectaron en los tres primeros días, tras lo cual desaparecen y son reemplazados por estafilococos menos sensibles al ácido y con mayor capacidad para crecer en anaerobiosis (Ordóñez *et al.*, 1995).

Algunos autores han determinado un incremento de los recuentos de micrococáceas al final de la maduración, Coppola *et al.* (1995) observaron que en salami se producía un crecimiento óptimo de estos microorganismos en la última fase del proceso de maduración, extremo observado por Selgas *et al.* (1986) y García *et al.* (1992) que además comprobaron que este incremento coincidía con un aumento del valor de pH al final del proceso.

III. 4. 4. Estafilococos

Los valores medios y las desviaciones típicas de los recuentos de estafilococos, expresados como log ufc/g, en los salchichones analizados se

muestran en la Tabla 31. En la Figura 25 se representa la evolución de esos valores a lo largo de la maduración.

Como se puede observar en la Tabla 31, los recuentos en la fase de amasado oscilaron entre 3,92 y 5,09 log ufc/g, correspondiendo los valores más altos a los embutidos de los lotes D y E (inoculados con los cultivos iniciadores comerciales) y el valor más bajo a los del lote A (control).

Todos los embutidos experimentaron un incremento progresivo de sus recuentos desde el amasado hasta la segunda semana de maduración, donde consiguieron un valor de 6,01 y 6,26 log ufc/g, para los embutidos de los lotes A y B; y 6,99 y 7,04 log ufc/g, para los de los lotes D y E, respectivamente. Con respecto a los embutidos del lote C (inoculados con el bioconservador 2) los recuentos se incrementaron hasta el día 9 de maduración donde, con un aumento del 22 %, alcanzando un valor de 5,72 log ufc/g. Este valor descendió ligeramente durante la segunda semana y volvió a incrementarse en la tercera, para mantenerse constante hasta el final del proceso, donde mostró un valor de 5,73 log ufc/g.

En el caso de los embutidos inoculados con el cultivo comercial 1, los recuentos continuaron incrementándose en la tercera semana hasta 7,11 log ufc/g que fue el máximo valor determinado para estafilococos, y que se correspondió con el lote de embutidos inoculados con el cultivo que poseía un mayor contenido de estafilococos viables. Estos incrementos suponen un aumento de los valores iniciales superior al 50 % para los lotes A, B y D y del 38 % para el lote E.

Durante la tercera semana los recuentos de los lotes A, B y E descendieron ligeramente y volvieron a incrementarse en la cuarta, alcanzando valores similares a los que presentaban a los 16 días de maduración, excepto en el lote E

Tabla 31. Valores medios (log ufc/g muestra) y desviaciones típicas de los recuentos de estafilococos en los diferentes lotes de salchichones analizados en las distintas etapas del proceso de elaboración.

Lotes	Amasado	Estufaje	Secado			
			1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
A-Control	3,92±0,36	5,06±0,26	5,21±0,63	6,01±0,55	5,73±0,73	6,19±0,71
B-Bioconser. 1	4,16±0,31	5,19±0,08	5,57±0,30	6,26±0,50	5,90±0,59	6,31±0,81
C-Bioconser. 2	4,69±0,40	5,17±0,63	5,72±0,88	5,54±0,87	5,72±0,40	5,73±0,34
D-Cultivo 1	4,73±0,30	5,40±0,06	6,23±0,44	6,99±0,62	7,11±0,82	7,01±0,79
E-Cultivo 2	5,09±0,26	6,02±0,22	6,63±0,34	7,04±0,65	6,42±0,80	5,96±0,55

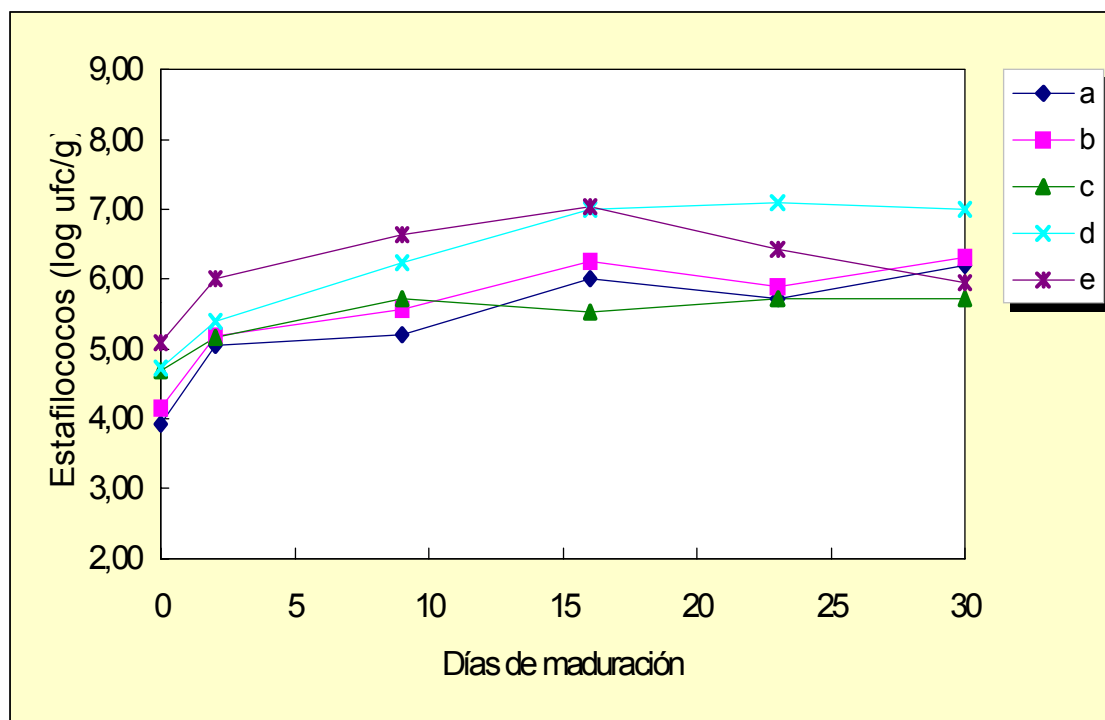


Figura 25. Evolución de los recuentos de estafilococos en los distintos lotes de salchichones analizados durante el proceso de maduración.

que continuaron disminuyendo hasta alcanzar un valor final de 5,96 log ufc/g, muy inferior al obtenido para el lote D, de 7,01 log ufc/g.

En el análisis estadístico se ha podido comprobar que existen diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los recuentos de los embutidos inoculados con los cultivos comerciales (lotes D y E) y el resto de embutidos, siendo los recuentos de los primeros mayores que los segundos, excepto en el caso del lote E en la cuarta semana de maduración. En cuanto a la evolución de los recuentos, se ha estimado que los valores determinados en el amasado y estufaje son significativamente más bajos ($p < 0,001$) que los hallados en el resto de etapas y que los recuentos del amasado son también significativamente menores ($p < 0,001$) que los del estufaje. En el resto de etapas no se apreciaron diferencias significativas ($p > 0,05$)

Los recuentos de estafilococos no patógenos, realizados sobre medio BP (Baird Parker) específico para *Staphylococcus* sp., fueron similares a los recuentos obtenidos para micrococáceas. El crecimiento en medio BP nos permite observar la evolución de los microorganismos pertenecientes al género *Staphylococcus* que son utilizados como iniciadores en la elaboración de los embutidos, y que en este caso eran las especies *Staphylococcus xylosus* y *Staphylococcus carnosus*. No obstante, Coventry y Hickey (1991) advirtieron de la dificultad de diferenciar los microorganismos iniciadores de la flora autóctona. Estos autores observaron que en embutidos inoculados con un cultivo mixto de *Lactobacillus plantarum* y *Staphylococcus carnosus*, los recuentos iniciales fueron más altos en el lote inoculado que en el control, y que posteriormente estos valores se mantuvieron prácticamente constantes, sin incrementos, tras el estufaje y durante la maduración. No obstante, afirman que *Staphylococcus carnosus* no creció bien en presencia de la cepa láctica y dudan de la eficacia y rentabilidad de la mezcla iniciadora utilizada en su experiencia. En otros trabajos en los que también se inocularon embutidos crudos curados con cultivos mixtos

de *Lactobacillus plantarum* y *Staphylococcus carnosus* se observó que los recuentos iniciales de estafilococos, cercanos a 7 log ufc/g, se mantenían prácticamente constantes durante todo el proceso de maduración (Ibañez *et al.*, 1996; Hierro *et al.*, 1997). En otros casos se observó un ligero descenso de los recuentos tras el estufaje, que volvieron a incrementarse a partir de la segunda semana de maduración (Coventry y Hickey, 1991). En nuestra experiencia, tras el estufaje se experimentó un incremento de los recuentos que coincide con lo observado por Montel *et al.* (1993), estos autores comprobaron que en embutidos inoculados con un cultivo mixto de *Lactobacillus sake* y *Staphylococcus carnosus* se producía un incremento de los recuentos iniciales de casi el 70 %; mientras que en los embutidos sin inocular los valores iniciales permanecieron prácticamente constantes.

Por otro lado, Sanz *et al.* (1997a, b) en experiencias similares, con embutidos que también habían sido inoculados con cultivos de *Lactobacillus sake* y *Staphylococcus carnosus*, obtuvieron recuentos iniciales superiores en los embutidos inoculados, con valores de 4,65 log ufc/g, frente a 3,30 log ufc/g que determinaron en el control. Estos valores se incrementaron tras el estufaje hasta 5,48 y 4,95 log ufc/g, para los embutidos inoculados y sin inocular, respectivamente, y descendieron ligeramente en el último período de maduración hasta 4,32 log ufc/g, igualándose al final del proceso. No obstante, y coincidiendo con lo observado por Lücke y Hechelman (1987), no se observó el incremento de los recuentos esperado en los embutidos inoculados con cepas de *Staphylococcus* sp. Esto podría explicarse si se tiene en cuenta que el uso de un cultivo mixto de bacterias lácticas origina una rápida y brusca caída del pH lo que provoca una inhibición temprana de los estafilococos. Sanz *et al.* (1997a), coincidiendo con las conclusiones de Coventry y Hickey (1991), sugieren que la adición de un cultivo mixto es menos efectiva de lo esperado y que se requiere un

estricto control de los parámetros de procesado cuando se utilizan este tipo de cultivos.

En cuanto a la combinación de cepas lácticas con *Staphylococcus xylosus*, Stahnke (1995a) señaló que la adición de *Pediococcus pentosaceus* a embutidos crudos curados inhibe el crecimiento de *Staphylococcus xylosus*, especialmente al comienzo de la maduración y en la fermentación, probablemente debido a la menor concentración de sal y a la disminución de pH. Finalmente, Kenneally *et al.*, (1998a) en un estudio comparativo observaron que, partiendo de recuentos iniciales próximos a 7 log ufc/g, se producía un descenso más acusado de los recuentos de *Staphylococcus xylosus* que de *Sytaphylococcus carnosus*, permaneciendo estos últimos prácticamente constantes. Este hecho fue previamente constatado por García *et al.* (1992), que observaron que los recuentos de *Staphylococcus xylosus* descendían progresivamente hasta valores mínimos de 3,7 log ufc/g al final de la maduración.

III. 4. 5. Enterobacterias

En la Tabla 32 se muestran los valores medios y las desviaciones típicas de los recuentos de enterobacterias, expresados como log ufc/g, determinados en los embutidos analizados. La evolución de estos valores a lo largo de la maduración y las rectas de regresión lineal para cada lote se representan en la Figura 26.

Como se puede apreciar en la Tabla 32, los recuentos iniciales oscilaron entre 4,55 y 5,22 log ufc/g. Durante el estufaje todos los embutidos experimentaron una reducción del número de enterobacterias que fue más acusada en los salchichones inoculados con los cultivos comerciales, con una disminución de los recuentos iniciales del 25 % y 30 % para los lotes D y E, respectivamente. Esto les permitió reducir en más de una unidad logarítmica los recuentos hallados en el amasado. Los lotes de embutidos B y C experimentaron

una reducción de los recuentos iniciales próxima al 15 % para el lote B y en torno al 9 % para el C, quedando con valores superiores a 4 log ufc/g. El lote control experimentó un descenso, del número de enterobacterias, de aproximadamente el 9 %, reduciendo en menos de una unidad logarítmica los recuentos iniciales.

Durante las dos primeras semanas de maduración el número de enterobacterias presentes en los embutidos de los lotes D y E permaneció prácticamente invariable, con valores próximos a 3,30 log ufc/g, sin embargo, en las dos últimas semanas volvió a descender hasta valores mínimos de 1,69 log ufc/g, para los embutidos del lote D, y 2,18 log ufc/g, para los del lote E. Esta disminución, unida a la experimentada en la fase de estufaje, supuso una reducción de los recuentos iniciales del 63 % y 55 % para los lotes D y E, respectivamente.

Los embutidos de los lotes B y C (inoculados con los bioconservadores 1 y 2) siguieron una dinámica muy similar entre sí. Tras el descenso más acusado del estufaje, los recuentos continuaron descendiendo hasta el final de la maduración, excepto en la segunda semana en las que los recuentos aumentaron ligeramente en los salchichones del lote C. En el momento final presentaron recuentos de 3,50 log ufc/g, para el lote B y 3,11 log ufc/g para el C, lo que supuso una reducción total del número de enterobacterias del 33 % y 39%, respectivamente. El lote correspondiente a los embutidos sin inocular (lote A) mostró una evolución similar a las anteriores, que al final llevaron a contabilizar recuentos de 2,93 log ufc/g que equivale a una reducción del 43 % de los recuentos iniciales.

Los coeficientes de velocidad de muerte celular calculados para los embutidos inoculados con cultivos iniciadores fueron los más elevados con valores de 0,368 y 0.317 para los lotes D y E, respectivamente. Los embutidos

Tabla 32. Valores medios (log ufc/g muestra) y desviaciones típicas de los recuentos de enterobacterias en los diferentes lotes de salchichones analizados en las distintas etapas del proceso de elaboración.

Lotes	Amasado	Estufaje	Secado	Secado	Secado	Secado
			1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
A-Control	5,15±0,40	4,33±0,14	3,58±0,40	3,35±0,30	3,30±0,42	2,93±0,37
B-Bioconser. 1	5,22±0,49	4,41±0,14	4,29±0,24	3,86±0,44	3,66±0,16	3,50±0,08
C-Bioconser. 2	5,07±0,30	4,62±0,32	4,12±0,05	4,34±0,33	3,33±0,42	3,11±0,33
D-Cultivo 1	4,55±0,38	3,45±0,19	3,49±0,11	3,27±0,36	2,71±0,45	1,69±0,52
E-Cultivo 2	4,84±0,53	3,33±0,20	3,28±0,33	3,16±0,33	2,81±0,57	2,18±0,63

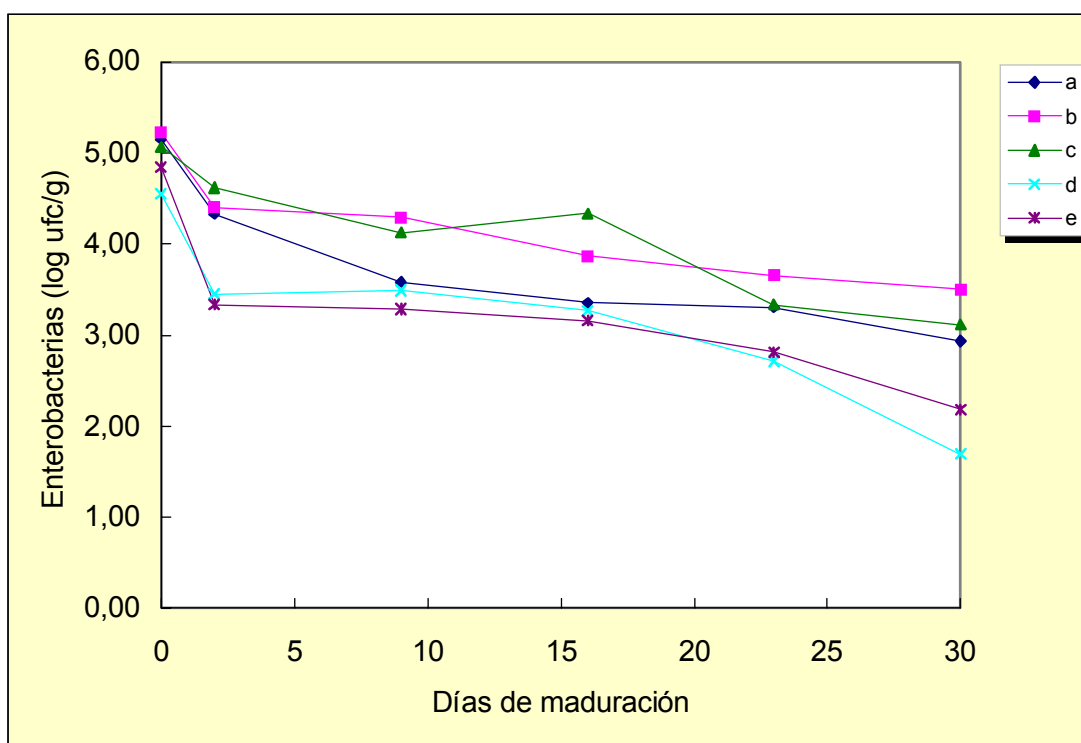


Figura 26. Evolución de los recuentos de enterobacterias en los distintos lotes de salchichones analizados durante el proceso de maduración.

inoculados con bioconservadores tuvieron una velocidad de muerte celular de 0,243 para el lote B y 0,300 para el lote C. Finalmente los embutidos control (lote A) mostraron un coeficiente de 0,309.

Los menores recuentos determinados a lo largo del proceso fueron para los lotes D y E, y este hecho se comprobó estadísticamente al obtener diferencias significativas ($p < 0,001$) entre estos embutidos y el resto. En cuanto al proceso de evolución, se ha comprobado que existen diferencias significativas entre las distintas etapas ($p < 0,001$), siendo, en general, los recuentos en el amasado mayores que los del estufaje y estos, a su vez, mayores que los de la primera semana. No obstante, no se apreciaron diferencias significativas entre los recuentos del día 9 y los del 16 ($p > 0,05$), aunque estos últimos si fueron diferentes que los de la tercera semana (día 23) y estos diferentes a los de la cuarta (día 30) ($p < 0,001$).

Los recuentos de enterobacterias en el amasado dependen básicamente de la calidad higiénica de las materias primas, en especial de la carne, tocino y especias, y de las condiciones de manipulación durante la elaboración. Los recuentos iniciales determinados en este trabajo, que oscilaron entre 4,50 y 5,15 log ufc/g, indican que la contaminación inicial es elevada. Sin embargo, estos valores son similares a los determinados por Lücke (1987) que obtuvo en la masa cárnica de partida recuentos próximos a 4 log ufc/g, y a los determinados por Bello y Sánchez-Fuertes (1995) que obtuvieron valores iniciales medios de 4,70 log ufc/g. Aunque en otros trabajos los recuentos iniciales oscilaron en torno a 3 log ufc/g e incluso inferiores (Papa *et al.*, 1995; Coppola *et al.*, 1995; Sanz *et al.*, 1997a, 1997b). No obstante, la Norma Microbiológica aplicable a embutidos crudos curados (BOE, 1977) no estipula un número de enterobacterias máximo permitido en el producto, ya que su presencia no supone un riesgo sanitario para el consumidor aunque puede originar problemas tecnológicos en la elaboración.

Se estima que recuentos inferiores a 10^2 ufc/g son aceptables desde un punto de vista higiénico y tecnológico (Montel *et al.*, 1993).

Sin duda, uno de los factores que provoca la reducción del número de enterobacterias en el embutido es la disminución del pH y de la a_w , sin embargo, las primeras horas de la fase de fermentación son especialmente críticas ya que el producto todavía no se ha estabilizado por estos factores (Leistner, 1995). En esta situación la inhibición de los microorganismos no deseables corre a cargo de los nitritos añadidos a la masa cárnica. En un estudio comparativo con salchichones elaborados con nitrato ó con nitrito, Sanz *et al.* (1997b) comprobaron que tras el estufaje los embutidos con nitratos experimentaron un incremento de los recuentos de enterobacterias que llegaron a duplicar los recuentos iniciales, alcanzando valores de 10^6 ufc/g, los cuales se reducían a lo largo de la maduración hasta 10^4 - 10^5 ufc/g. En cambio, los embutidos inoculados con nitrito redujeron los recuentos iniciales y continuaron descendiendo hasta valores finales insignificantes, inferiores a 10^2 ufc/g. Este efecto del nitrito ya había sido recogido previamente por Leistner (1978) y Lücke (1987) que advierte de las ventajas higiénicas de la utilización del nitrito como sal curante.

En nuestro caso puede deducirse que el mayor efecto inhibitor durante la fase de estufaje se debe a la reducción del pH. Como puede observarse en la Figura 26, los embutidos inoculados con los cultivos iniciadores experimentaron la reducción más intensa de los recuentos de enterobacterias durante esta etapa, que coincide también con una mayor disminución de pH. En cambio no se aprecia efecto inhibitor de los bioconservadores sobre el crecimiento de las enterobacterias, cuyos recuentos durante el estufaje mantienen valores similares a los embutidos del lote control. En este sentido, se ha establecido una correlación positiva altamente significativa entre el pH y los recuentos de enterobacterias ($p < 0,001$), que prueba que a medida que se reduce el pH también se reducen los recuentos de enterobacterias. También se ha observado una correlación negativa

entre la cantidad de ácido láctico en los salchichones y los recuentos de enterobacterias ($p < 0,01$), que pone de manifiesto que a mayores concentraciones de ácido láctico se reducen los recuentos de enterobacterias.

En otros trabajos también se ha comprobado una reducción de los recuentos de enterobacterias en el estufaje (Papa *et al.*, 1995; Bello y Sánchez-Fuertes, 1995; Coppola *et al.*, 1995). Por otro lado, Sanz *et al.* (1997a) constataron una mayor reducción en los embutidos inoculados con cultivos iniciadores (*Lactobacillus sake* + *Staphylococcus carnosus*) que en los no inoculados, que vieron duplicados sus recuentos iniciales.

Como se ha mencionado anteriormente, en el proceso de desecación es la bajada inicial de la a_w , tras la adición de los ingredientes (desde 0,99 hasta 0,97, aproximadamente), el principal obstáculo que dificulta el crecimiento de las enterobacterias, aunque también influye la competencia con otros microorganismos mejor adaptados a las condiciones imperantes, como pueden ser lactobacilos y micrococáceas (Zambonelli *et al.*, 1992). Numerosos autores han comprobado la total desaparición de las enterobacterias en el plazo de un mes de maduración (Rozier, 1969; Pozo, 1985; Bello y Sánchez.-Fuertes, 1995; Coppola *et al.*, 1995) aunque en otros casos, esto sólo se consigue con un mayor tiempo de maduración (Papa *et al.*, 1995; Sanz *et al.*, 1997b). No obstante, Lücke (1987) en embutidos de maduración lenta (temperatura de maduración de 18°C) y tras 21 días de secado comprobó que los recuentos superaban las 10^3 ufc/g.

En nuestro caso es probable que los altos valores de a_w observados al final del proceso (Tabla 22) no hallan permitido la inhibición total de las enterobacterias, lo que indicaría la necesidad de incrementar el tiempo de maduración con el fin de obtener un producto final con mejores condiciones higiénicas y sanitarias.

III. 4. 6. Coliformes

En la Tabla 33 se muestran los valores medios y las desviaciones típicas de los recuentos de coliformes (expresado como log ufc/g) de los distintos lotes de salchichones analizados. Y en la Figura 27 se representa la evolución de estos valores y las rectas de regresión lineal para cada lote de embutidos a lo largo del proceso de maduración.

Como puede observarse en la Tabla 33 los recuentos iniciales fueron muy similares para todos los lotes de embutidos, oscilando entre 4,04 y 4,91 log ufc/g, y es durante el estufaje cuando comienzan a establecerse las diferencias.

En la Figura 27 se aprecia que en general los recuentos experimentaron un descenso, que fue más acusado en los embutidos inoculados con cultivos iniciadores comerciales (lotes D y E). Los valores iniciales se redujeron, aproximadamente, el 40 % en el estufaje, obteniéndose valores de 2,37 y 2,59 log ufc/g, para los lotes D y E respectivamente. Tras estos el mayor descenso lo experimentaron los embutidos inoculados con bioconservadores, lotes B y C, que vieron reducidos sus recuentos iniciales en 25 % y 22 %, lo que les llevó a obtener valores de 3,43 y 3,85 log ufc/g, respectivamente. Finalmente, la menor reducción la experimentaron los embutidos sin inocular (lote A), cuyos valores iniciales decrecieron un 14 %.

Durante la maduración se puede apreciar, Figura 27, un ligero descenso de los recuentos para todos los lotes de embutidos, aunque en algunos casos se produjeron suaves incrementos. Los embutidos inoculados con el cultivo comercial 2 mostraron la mayor velocidad de muerte celular con un valor de 0,297, seguidos de los embutidos de los lotes A y B (control e inoculados con el bioconservador 1), con valores de 0,270 y 0,232, respectivamente. El menor coeficiente de muerte celular lo presentaron los embutidos de los lotes C y D que

Tabla 33. Valores medios (log ufc/g muestra) y desviaciones típicas de los recuentos de coliformes en los diferentes lotes de salchichones analizados en las distintas etapas del proceso de elaboración.

Lotes	Amasado	Estufaje	Secado	Secado	Secado	Secado
			1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
A-Control	4,91±0,58	4,22±0,18	4,35±0,64	3,79±0,30	3,50±0,46	3,02±0,64
B-Bioconser. 1	4,58±0,79	3,43±0,21	3,41±0,31	3,67±0,74	3,51±0,36	2,30±0,97
C-Bioconser. 2	4,29±0,34	3,36±0,29	3,03±0,60	2,69±0,40	2,70±0,60	2,84±0,49
D-Cultivo 1	4,04±0,64	2,37±0,37	3,04±0,82	3,00±0,72	2,48±0,40	2,08±0,79
E-Cultivo 2	4,58±0,61	2,59±0,26	2,59±0,52	2,04±0,47	1,71±0,54	2,27±0,37

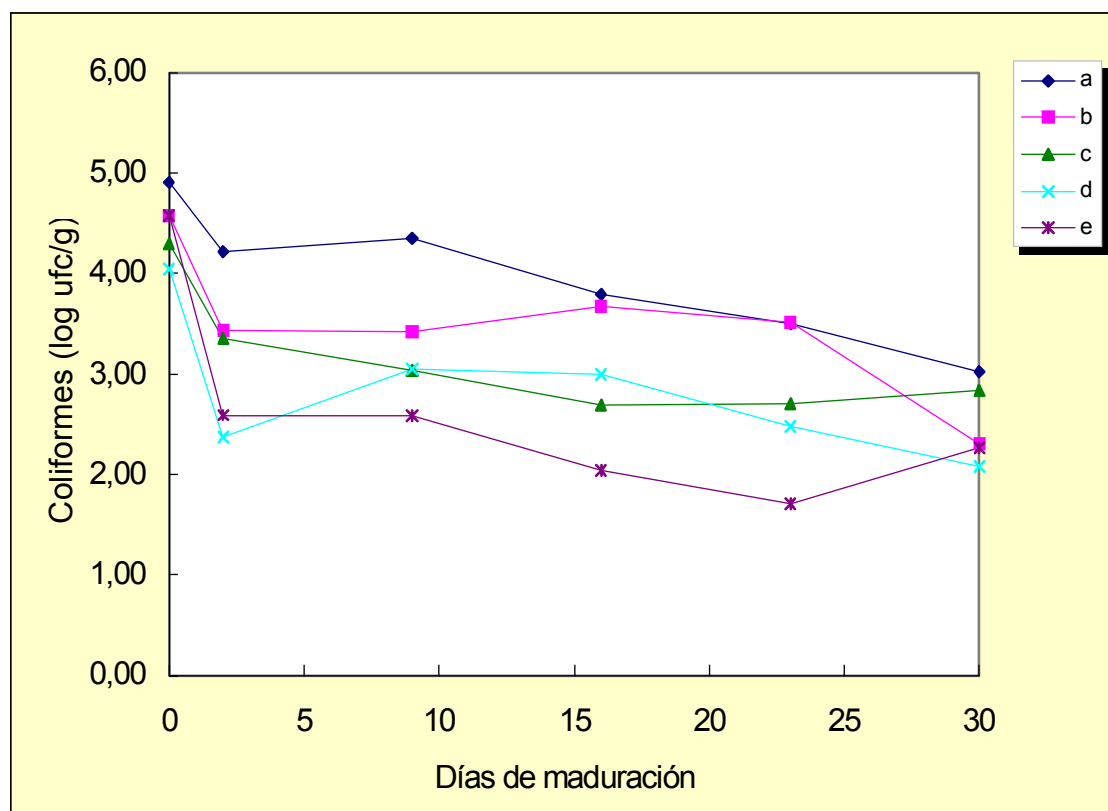


Figura 27. Evolución de los recuentos de coliformes en los distintos lotes de salchichones analizados durante el proceso de maduración.

tuvieron un valor de 0,197 y 0,194, respectivamente. No obstante y pese a que los embutidos inoculados con el cultivo comercial 1 (lote D) mostraron el menor coeficiente de muerte celular, puede observarse en la Figura 27, que durante la fase de estufaje estos embutidos sufrieron la mayor reducción de los recuentos de coliformes junto a los embutidos del lote E. Además los salchichones de estos dos lotes fueron los que presentaron los menores recuentos durante toda la maduración.

Al final del proceso se pueden diferenciar dos grupos de embutidos. De un lado, los salchichones de los lotes B, D y E, que presentaron los recuentos más bajos, con valores de 2,30, 2,08 y 2,27 log ufc/g respectivamente; equivalente a una reducción de los recuentos iniciales de aproximadamente el 50 %. De otro lado, los embutidos de los lotes A y C, que mostraron los recuentos más elevados, 3,02 y 2,84 log ufc/g respectivamente; que en su caso se corresponden con una disminución global del 34 % y el 38 %.

En el análisis estadístico se ha comprobado que los recuentos determinados en el lote control (lote A) son significativamente más elevados ($p < 0,001$) que los determinados en los salchichones del resto de lotes. Asimismo, los embutidos inoculados con los cultivos iniciadores comerciales (lotos D y E) mostraron recuentos significativamente más bajos que los hallados en el lote B, mientras que en el caso del lote C (bioconservador 2), sólo el cultivo iniciador 2 (lote E) mostró valores significativamente más bajos ($p < 0,001$).

En cuanto a la evolución de los recuentos a lo largo de la maduración se aprecia que los valores en el amasado son significativamente más altos ($p < 0,001$) que los del resto de etapas; y los del estufaje son también más elevados que los de la segunda, tercera y cuarta semana. Por otro lado, los recuentos de la primera y segunda semana no mostraron diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$) aunque si se apreciaron entre estos y los recuentos de la cuarta

semana ($p < 0,001$). Finalmente, no se apreciaron diferencias significativas entre los recuentos de la tercera y cuarta semana entre sí ($p > 0,05$).

Los recuentos de coliformes obtenidos (Tabla 33) son muy similares a los de enterobacterias (Tabla 32). De hecho los coliformes pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* aunque tienen la particularidad de fermentar la lactosa en presencia de sales biliares, a diferencia del resto de microorganismos de esta familia. Su presencia en el alimento nos advierte de la posibles existencia de patógenos entéricos (*Salmonella*, *Shigella*) aunque no indican que estén necesariamente presentes. Los coliformes son, por tanto, microorganismos indicadores de contaminación fecal.

La Legislación Alimentaria no establece un límite máximo del número de estos microorganismos en los embutidos crudos curados, como puede comprobarse en la Norma Microbiológica (BOE, 1977). Sin embargo, estos microorganismos son considerados tecnológicamente indeseables, ya que pueden originar graves defectos en los embutidos, por lo que es necesario controlar su presencia (Jessen, 1995).

Teniendo en cuenta que son enterobacterias, su llegada al alimento se realiza fundamentalmente a través de las materias primas ó por una manipulación inadecuada y poco higiénica. La contaminación de la pimienta, usada en la elaboración de embutidos fermentados, con bacterias coliformes puede originar la alteración de los productos debido a la formación de gas que producen estos microorganismos. Ordóñez *et al.* (1990) obtuvieron recuentos de viables totales en pimienta del orden de 10^8 ufc/g.

La mayoría de las referencias bibliográficas relacionadas con la calidad microbiológica de los embutidos crudos curados estudian la evolución de las enterobacteriaceas totales, incluyendo a los coliformes. No obstante Palumbo *et*

al. (1976) determinaron coliformes fecales en embutidos crudos curados comerciales y obtuvieron recuentos en el producto final de 3,25 log ufc/g, cuando utilizaban cultivos iniciadores y nitrito como sal curante. Estos valores son ligeramente superiores a los observados en nuestro estudio, donde se obtuvieron recuentos que oscilaron entre 2,08-2,27 log ufc/g para los salchichones inoculados con cultivos iniciadores comerciales.

Los recuentos de coliformes obtenidos en este trabajo son ligeramente superiores a los obtenidos por otros autores que observaron una reducción total del número de coliformes después de un mes de maduración (Rozier, 1969; Pozo, 1985). No obstante, Huang y Lin (1995) comprobaron que en embutidos madurados con bajas temperaturas (3° C) los recuentos de coliformes después de 6 semanas de maduración eran superiores a 2,5 log ufc/g en cambio en embutidos madurados a 25° C, en la tercera semana, los recuentos se habían reducido a < 1 log ufc/g. Además comprobaron que los embutidos inoculados con cultivos iniciadores conseguían reducir los recuentos de coliformes antes que los embutidos de los lotes sin inocular. Es probable que la inhibición de estos microorganismos, al igual que sucede con las enterobacterias, se produzca en las primeras fases de la maduración debido a la reducción inicial de la a_w por la adición de los ingredientes a la masa cárnica, no obstante Hammes y Knauf (1992) observaron una importante reducción de los coliformes en embutidos crudos curados que atribuyeron a la acción conjunta de las bacterias lácticas y la adición de nitritos. Por otro lado, Schillinger y Lücke (1991) mediante pruebas de inhibición en placa, observaron que cultivos de *Citrobacter freundii* se reducían en un 47 % cuando eran inoculados con un cultivo de *Lactobacillus sake*.

III. 4. 7. Enterococos (Estreptococos del grupo D de Lancefield)

En la Tabla 34 se muestran los valores medios y las desviaciones típicas de los recuentos de enterococos, antes denominados estreptococos del grupo D de Lancefield y que incluye a los especies *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus faecium*. La evolución de estos recuentos a lo largo de la maduración de los embutidos se representa en la Figura 28.

En la Tabla 34 puede apreciarse que los recuentos iniciales de enterococos, en todos los salchichones, apenas si superaron el valor de 2 log ufc/g. Durante el estufaje se produce un incremento de los recuentos en el lote A (control), los valores iniciales se vieron aumentados en más del 50 %, alcanzando valores de 3,18 log ufc/g. El resto de embutidos durante este período mantuvieron sus recuentos prácticamente constantes, excepto en el caso del lote E, que descendieron ligeramente. El número de enterococos en estos lotes osciló entre 1,48 y 1,85 log ufc/g.

En la Figura 28, puede apreciarse que tras el estufaje se acentúan las diferencias de los embutidos del lote A con respecto al resto. En todo el proceso de maduración los recuentos de este lote fueron los más altos con valores máximos de 2,90 log ufc/g, que se alcanzaron en la primera semana de maduración. En un término medio se mantuvieron los embutidos inoculados con los bioconservadores (lotes B y C), que durante la primera semana experimentaron una ligera subida en sus recuentos, aunque los valores volvieron a descender en la siguiente semana. Al final se determinaron unos valores de 1,80 y 2,07 log ufc/g para los lotes B y C, respectivamente. Por último, los embutidos inoculados con los cultivos comerciales mostraron los recuentos más bajos, aunque se observaron ligeras oscilaciones durante todo el proceso, al final los valores determinados fueron de 1,21 log ufc/g para el lote D y 1,39 log ufc/g para el lote E.

Tabla 34. Valores medios (log ufc/g muestra) y desviaciones típicas de los recuentos de enterococos en los diferentes lotes de salchichones analizados en las distintas etapas del proceso de elaboración.

Lotes	Amasado	Estufaje	Secado	Secado	Secado	Secado
			1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
A-Control	1,98±0,42	3,18±0,70	2,90±0,64	2,77±0,71	2,58±0,87	2,60±0,76
B-Bioconser. 1	1,51±0,52	1,72±0,70	2,36±1,01	1,87±1,38	1,86±1,32	1,80±1,31
C-Bioconser. 2	1,49±1,16	1,48±0,37	2,08±0,06	2,01±0,25	2,14±0,57	2,07±0,53
D-Cultivo 1	1,30±0,74	1,85±0,62	1,78±1,28	2,08±0,56	1,46±1,06	1,21±0,85
E-Cultivo 2	2,10±0,55	1,63±1,37	1,36±1,00	1,45±1,03	1,71±0,51	1,39±1,05

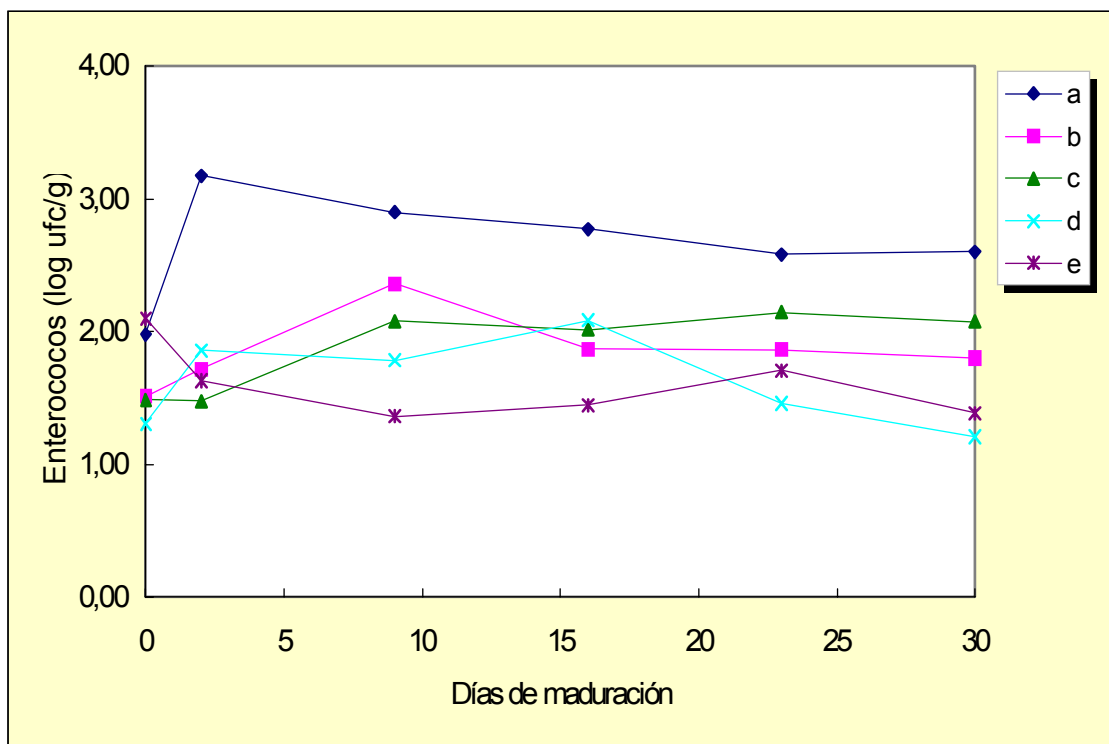


Figura 28. Evolución de los recuentos de enterococos en los distintos lotes de salchichones analizados durante el proceso de maduración.

El análisis de varianza de los resultados obtenidos nos permitió establecer diferencias significativas entre los distintos lotes de embutidos. Así los salchichones de los lotes A y C mostraron recuentos significativamente más elevados ($p < 0,001$) que los de los lotes B, D y E. De estos datos se puede deducir que el empleo de los cultivos iniciadores comerciales o del bioconservador 1 inhibe el desarrollo de los enterococos en el embutido, evitando las posibles alteraciones que puede conllevar su crecimiento. En cuanto a la evolución de los recuentos a lo largo de la maduración, no se han podido establecer diferencias significativas entre las distintas etapas del proceso ($p > 0,05$).

Como se ha mencionado anteriormente, bajo la denominación de enterococos se agrupan dos especies microbianas, *Streptococcus faecium* y *Streptococcus faecalis*, presentes en el tracto intestinal del hombre y de los animales. Su elevada resistencia a la desecación, a las temperaturas extremas y a los agentes desinfectantes y detergentes, les convierten en un excelente índice sanitario. Los enterococos no son microorganismos patógenos pero, al igual que sucede con las enterobacterias y coliformes, una contaminación elevada puede originar defectos en el producto. No obstante la Norma Microbiológica (BOE, 1977) no regula su presencia en los embutidos crudos curados.

Los recuentos iniciales obtenidos en este trabajo, próximos a 2 log ufc/g, son sensiblemente inferiores a los encontrados por otros autores que superan el valor de 3 log ufc/g (Coppola *et al.*, 1995) e incluso 5 log ufc/g (Papa *et al.*, 1995;). En una experiencia con salami inoculado con *Lactobacillus plantarum*, Papa *et al.* (1995) observaron que tras el estufaje se producía un incremento de los recuentos iniciales hasta duplicar su valor, quedando con recuentos de 5,6-5,7 log ufc/g, posteriormente estos valores se mantendrían constantes durante todo el proceso de maduración. Por otro lado, Samelis (1994) en embutidos fermentados naturalmente, es decir sin adición de cultivos iniciadores, también observó un

incremento de los recuentos iniciales que le llevó a obtener recuentos superiores a 8 log ufc/g, no obstante tras 20 días de maduración los enterococos no pudieron ser detectados en el embutido. También, Coppola *et al.* (1995) estudiaron la evolución de los distintos grupos de microorganismos en un tipo de salami artesanal y comprobaron que, partiendo de recuentos de enterococos próximos a 4 log ufc/g, a los quince días de maduración no superaban el valor de 1 log ufc/g.

La inhibición de los enterococos en los embutidos crudos curados puede atribuirse al descenso del pH que se produce durante la fermentación. Schillinger y Lücke (1991), aplicando la técnica de inhibición en placa, observaron que el sobrenadante de un cultivo de *Lactobacillus sake* ejercía cierto efecto inhibitor sobre *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus faecium*, lo cual indica la sensibilidad de estos microorganismos a determinados metabolitos producidos durante el crecimiento de la cepa láctica. No obstante, Rodríguez *et al.* (1988) en un trabajo similar no observaron inhibición alguna sobre el crecimiento de los enterococos, al aplicar el sobrenadante de un cultivo de *Lactobacillus plantarum*. En nuestro caso, no se pudo establecer una correlación significativa entre el pH y los recuentos de enterococos ($r = -0,1943$; $p > 0,05$).

En ocasiones los enterococos han sido utilizados como microorganismos iniciadores (Leistner, 1995). A *Streptococcus faecalis* se le atribuye cierta actividad lipolítica (Kröckel, 1995). Sin embargo, la cualidad más apreciada de estos microorganismos es su capacidad para producir bacteriocinas capaces de inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, *Clostridium* sp y *Staphylococcus aureus* (Mckay, 1990; Arihara *et al.*, 1993; Garriga *et al.*, 1993; Giraffa, 1995).

III. 4. 8. *Staphylococcus aureus*

En la Tabla 35 se muestran los valores medios y las desviaciones típicas de los recuentos de *Staphylococcus aureus* (*Staph. aureus*) en los salchichones analizados a lo largo del proceso de maduración.

Como se puede observar en la Tabla 35, los recuentos iniciales oscilaron entre 2,36 y 3,27 log ufc/g. Los valores más elevados, correspondientes a los lotes B, C y D, superiores a 3 log ufc/g descendieron durante el estufaje en más de una unidad logarítmica. En cambio los embutidos de los lotes A y E mantuvieron, durante el estufaje, sus recuentos constantes. Durante la primera semana de maduración, tres de los lotes de salchichones analizados mostraron recuentos inferiores a 2 log ufc/g (lotes B, D y E), que es el criterio microbiológico que establece la Legislación Alimentaria (BOE, 1977). Por el contrario los lotes A y C no consiguieron bajar de este límite hasta la segunda semana de maduración. Esto indica que tras 16 días de maduración todos los embutidos analizados cumplían el requisito microbiológico, en cuanto al recuento de *Staphylococcus aureus*, establecido por la Legislación.

El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos ha revelado que los recuentos en los embutidos del lote C fueron significativamente más elevados ($p < 0,001$) que en el resto de lotes, además, los valores determinados en el lote E, fueron los más bajos de todos ($p < 0,001$). Con respecto a los recuentos de los lotes A, B y D no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre sí.

Distintos autores han confirmado que la prevalencia de *Staphylococcus aureus* en carne cruda es alta (Pullen y Genigeorgis, 1977; Genigeorgis, 1978). Los niveles son generalmente inferiores a 5×10^2 ufc/g aunque ocasionalmente pueden superar las 7×10^5 ufc/g (Genigeorgis, 1978). El grado de contaminación depende fundamentalmente de las materias primas empleadas y de la

Tabla 35. Valores medios (expresado como log ufc/g muestra) y desviaciones típicas de los recuentos de *Staphylococcus aureus* en los diferentes lotes de salchichones analizados.

Lotes	Amasado	Estufaje	Secado	Secado	Secado	Secado
			1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
A-Control	2,36±0,13	2,32±0,15	2,03±0,02	<2	<2	<2
B-Bioconser. 1	3,06±0,34	2,07±0,05	<2	<2	<2	<2
C-Bioconser. 2	3,22±0,16	2,41±0,47	2,05±0,05	<2	<2	<2
D-Cultivo 1	3,27±0,21	2,10±0,08	<2	<2	<2	<2
E-Cultivo 2	2,38±0,23	2,17±0,10	<2	<2	<2	<2

manipulación durante el procesado. En este caso, los recuentos iniciales de *Staphylococcus aureus* obtenidos en los salchichones no superan el valor de 4 log ufc/g, aunque son ligeramente superiores a los obtenidos por Papa *et al.* (1995), que partiendo de unos valores en el amasado de 2,3 log ufc/g consiguen una reducción de los niveles hasta valores insignificantes (< 2 log ufc/g) en un plazo de 21 días de maduración.

La inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* en embutidos crudos curados, antes de que se cumpla el tiempo de maduración normal, se confirma en la mayoría de los casos (Martínez *et al.*, 1982; Ibáñez *et al.*, 1997; González-Fandos *et al.*, 1997), incluso sin la adición de cultivos iniciadores, por lo que no son frecuentes los casos de intoxicaciones alimentarias estafilocócicas por consumo de embutidos crudos curados. No obstante, la mayor parte de intoxicaciones por consumo de estos alimentos se atribuyen a *Staph. aureus* (Hechelmann *et al.*, 1988). Esto es debido a la elevada resistencia de este microorganismo, es tolerante a la sal y al nitrito y a pesar de desarrollarse mejor

en aerobiosis, es capaz de crecer en ambientes anaerobios, de hecho, se ha comprobado que existe mayor crecimiento de *Staph. aureus* en la línea externa de los embutidos que en el centro, ya que hay mayor disponibilidad de oxígeno en el exterior del embutido (Lücke, 1985). Sin embargo, es un pobre competidor a bajas temperaturas, condiciones anaeróbicas y valores bajos de pH.

En embutidos crudos, *Staph. aureus* puede desarrollarse durante la fase logarítmica de crecimiento de los lactobacilos y alcanzar elevados recuentos, además, se ha demostrado que puede producir al menos cinco enterotoxinas diferentes, las cuales son resistentes a la papaina, tripsina y quimotripsina, y son estables al calor, aunque desaparecen rápidamente en presencia de sustancias reductoras como el ascorbato y el nitrito. Por todo esto, son numerosos los organismos que sugieren medidas para la inhibición de este patógeno en embutidos crudos curados. En 1982, el Código de Buenas Prácticas de Elaboración para embutidos secos y semisecos recomendó que el pH debía descender hasta 5,2 en las primeras 48 horas y que la temperatura de fermentación debía mantenerse por debajo de 25° C. En el mismo año, el Instituto Americano de la Carne recomendó la adición de bacterias ácido lácticas para acelerar la reducción del pH de los embutidos secos y semisecos a 5,3 en los tiempos estimados (80 horas a 24° C y 18 horas a 43° C; Bacus, 1984). Estos criterios son considerados básicos para prevenir el crecimiento de *Staph. aureus*, a temperaturas que de otra manera lo favorecería.

Al margen de estas medidas, el curado establece condiciones selectivas para el crecimiento de *Staph. aureus* debido a la reducción de la a_w y a la acción inhibidora que ejerce el nitrito. Aunque algunas investigaciones sugieren que la pequeñas cantidades de nitrito usadas en embutidos curados (120-150 ppm) no inhiben el crecimiento de determinados patógenos como *Salmonella* sp., *Clostridium botulinum* y *Staph. aureus* (Lücke, 1985; Varnam y Evans, 1991), hay que considerar que el nitrito sólo puede ser efectivo cuando se combina con

otros factores inhibidores como reducidos valores de a_w y pH. Como se ha mencionado anteriormente, en la elaboración de embutidos cárnicos curados, la a_w de la carne de partida se reduce mediante la adición de sal, grasa y otros ingredientes hasta valores próximos a 0,96-0,97. El crecimiento de las bacterias Gram negativas se ve mermado con valores de a_w inferiores a 0,97 y los límites de crecimiento para las bacterias lácticas se establecen entre 0,91 y 0,94, sin embargo *Staph. aureus* puede crecer incluso hasta valores de a_w de 0,860. Esta ventaja de *Staph. aureus* frente a las bacterias lácticas supone un riesgo añadido durante la primera semana de maduración que puede dar lugar a importantes defectos en el proceso si no se toman las medidas adecuadas (Stiebing y Rödel, 1988).

Por otro lado, el empleo de temperaturas de maduración superiores a 25° C favorece el desarrollo de *Staph. aureus* incrementando el riesgo de que aparezcan fermentaciones defectuosas, esto se puede evitar con la utilización de cultivos iniciadores de bacterias lácticas (Raccach, 1981). Numerosos autores han investigado la inhibición que produce el crecimiento de las bacterias lácticas sobre el de *Staphylococcus aureus* (Daly *et al.*, 1973; Abdel-Bar y Harris, 1984; Daeschel, 1989; Schillinger y Lücke, 1991; González-Fandos *et al.*, 1997). Se ha demostrado la sensibilidad que presenta *Staph. aureus* frente a determinados metabolitos producidos por las bacterias lácticas como el CO₂ (Dixon y Kell, 1989) y el peróxido de hidrógeno (Dahiya y Speck, 1968), además al tratarse de una bacteria Gram positiva se incluye en el espectro de acción inhibidora de numerosas bacteriocinas, entre la que destaca la nisina (Daeschel, 1989).

III. 4. 9. *Escherichia coli*

La Norma de Calidad Microbiológica establece como límite microbiológico para *E. coli* recuentos inferiores a 10² ufc/g (BOE, 1977). En los embutidos analizados en este estudio no se obtuvieron resultados positivos en

ninguna de las muestras estudiadas, por lo que cumplen el requisito higiénico exigido.

Dentro de los coliformes la especie más representativa es *Escherichia coli* que se diferencia del resto de coliformes por no ser capaz de hidrolizar el citrato. *E. coli* tiene como habitat natural el tracto digestivo del hombre y animales de sangre caliente. Algunas cepas son capaces de producir síndromes de toxiinfección alimentaria sobre todo en la población infantil, por otro lado los adultos se pueden hacer portadores del germen una vez que han sufrido la enfermedad. Este microorganismo llega a los alimentos por contaminación fecal, bien sea a través de portadores humanos ó por contacto con aguas residuales insuficientemente tratadas (Doyle y Schoeni, 1984).

Hasta la década de los 80 los casos publicados de intoxicaciones alimentarias por *E. coli* asociadas al consumo de embutidos cárnicos fueron escasos (Bryan, 1980). A partir de 1982 se conocen tres cepas de *E. coli* capaces de producir cuadros de gastroenteritis en el hombre: *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* enteropatógeno (EPEC) y *E. coli* enteroinvasivo (EIEC) (Kornacki and Marth, 1982). Todos los casos de intoxicaciones alimentarias atribuidos a estos microorganismos han sido directa o indirectamente ligados a contaminación fecal humana (alimentos contaminados por aguas de origen fecal o manipuladores infectados) (Doyle, 1984).

Hasta la fecha las investigaciones realizadas han revelado que en los embutidos crudos curados la fermentación y el proceso de secado sólo consiguen efectuar una reducción de aproximadamente 2 unidades logarítmicas de ufc/g de estos patógenos (Glass *et al.*, 1992; Hinkens *et al.*, 1996; Clavero y Beuchat, 1996). Por lo que actualmente todos los esfuerzos se dirigen a la identificación de factores adicionales que permitan obtener una mayor reducción del número de estos patógenos en los productos crudos curados. Faith *et al.* (1997) afirman que

los factores que más afectan al crecimiento de las cepas de *E. coli* patógenas son una adecuada combinación de los parámetros tiempo, temperatura y pH, en detrimento de otros factores como especias, sales curantes y cultivos lácticos. En este sentido, Glass *et al.* (1992) comprobaron que en embutidos inoculados con una cepa de *E. coli* O157:H7 apenas se apreciaban escasas diferencias en la inhibición de estos microorganismos cuando se adicionaban con cultivos iniciadores de bacterias lácticas con respecto a los embutidos sin inocular. Por otro lado, Leyer *et al.* (1995) descubrieron la existencia de determinadas cepas de *E. coli* resistentes al ácido y capaces de tolerar mejor las condiciones de acidez que se producen durante la fermentación y maduración de los embutidos crudos curados.

III. 4. 10. Levaduras y mohos

Los valores medios y las desviaciones típicas de los recuentos de levaduras y mohos determinados en los salchichones analizados se muestran en la Tabla 36. La evolución de estos valores, expresados como log ufc/g, a lo largo de la maduración se representa en la Figura 29.

Como puede observarse en la Tabla 36, los recuentos iniciales oscilaron entre 4,23 y 5,34 log ufc/g. Estos valores experimentaron un descenso durante la fase de estufaje que fue más acusado en los embutidos de los lotes A, B y E; donde los valores iniciales se redujeron en más de 1,6 unidades logarítmicas, e incluso llegaron a superar las dos unidades en el caso del lote E. En cambio, los lotes C y D sufrieron una reducción menor de los recuentos, próxima a una unidad logarítmica.

En la primera y segunda semanas de maduración se produjo un aumento generalizado de los recuentos respecto del estufaje, que alcanzaron las cotas máximas con valores que oscilaron entre 3,81 y 4,94 log ufc/g, a partir de este

momento volvieron a descender. Al final de la maduración los valores más altos, 4,39, 3,93 y 4,33 log ufc/g correspondieron a los embutidos de los lotes A, B y C (control e inoculados con bioconservadores); y los más bajos 3,15 y 3,58 log ufc/g a los embutidos inoculados con cultivos iniciadores (lotes D y E).

El análisis estadístico de los resultados refleja que existen diferencias significativas en los recuentos entre los distintos lotes de embutidos, siendo los valores hallados en los embutidos sin inocular (lote A) significativamente más altos ($p < 0,001$) que los del resto. También se ha comprobado que las diferencias entre los recuentos de las distintas etapas de maduración son significativas ($p < 0,001$).

La evolución de las levaduras y mohos durante la maduración de los embutidos crudos curados ha sido descrita por Andersen (1992). Según este autor durante los primeros días los recuentos de levaduras son mayoritarios, un 95 % frente a sólo el 5 % de mohos, a medida que avanza la maduración estas cifras se invierten para al final observarse un 95 % de mohos frente al 5 % de levaduras. Esto se debe a que los mohos son más tolerantes a la reducción de la a_w que las levaduras.

Los recuentos iniciales de levaduras y mohos obtenidos en este estudio fueron similares a los determinados por otros autores (Samelis *et al.*, 1993-1994; Papa *et al.*, 1995). El descenso de los valores que se determinó durante el estufaje había sido descrito previamente por Palumbo *et al.* (1976) que observaron cómo los recuentos iniciales se reducían a valores mínimos en esta etapa, después, durante la maduración, los recuentos volvían a elevarse hasta alcanzar cotas de 5 log ufc/g. Coppola *et al.* (1995) también comprobaron una reducción de los recuentos de levaduras y mohos durante la fermentación del salami y lo atribuyeron al efecto negativo que el humo puede ejercer sobre las levaduras (Zambonelli *et al.*, 1992).

Tabla 36. Valores medios (log ufc/g muestra) y desviaciones típicas de los recuentos de levaduras y mohos en los diferentes lotes de salchichones analizados en las distintas etapas del proceso de elaboración.

Lotes	Amasado	Estufaje	Secado			
			1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
A-Control	5,34±0,55	3,70±0,30	4,28±0,81	4,62±0,18	4,27±0,16	4,39±0,25
B-Bioconser. 1	5,09±0,36	3,27±0,35	4,21±0,68	4,94±0,38	4,36±0,41	3,93±0,10
C-Bioconser. 2	4,23±0,73	3,50±0,16	3,81±0,61	4,51±0,03	3,65±0,04	4,33±0,12
D-Cultivo 1	4,39±0,42	3,45±0,29	4,07±0,60	4,29±0,91	4,64±0,19	3,15±0,37
E-Cultivo 2	4,95±0,23	2,89±0,34	4,21±0,69	4,25±0,96	4,38±0,34	3,58±0,48

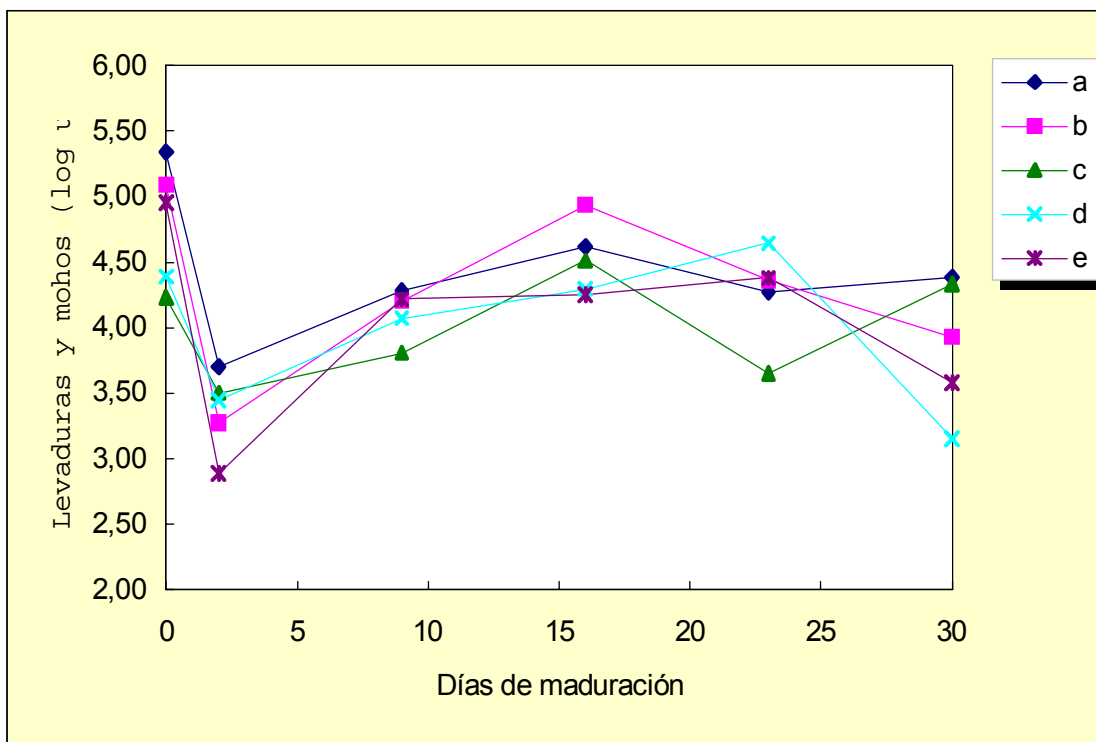


Figura 29. Evolución de los recuentos de levaduras y mohos en los salchichones analizados durante el proceso de maduración.

Sin embargo, Ordóñez *et al.* (1995) afirman que el desarrollo de estos microorganismos también puede verse afectado por las temperaturas iniciales de maduración, es probable que las temperaturas establecidas durante el estufaje afectaran a su crecimiento.

Samelis *et al.* (1993, 1994), en sendos trabajos con embutidos fermentados naturalmente, comprobaron que a medida que avanzaba la maduración los recuentos de levaduras y mohos permanecían prácticamente constantes obteniéndose al final valores próximos a 5 log ufc/g. Estos recuentos son ligeramente superiores a los obtenidos por Papa *et al.* (1995) que determinaron valores finales inferiores a 4 log ufc/g, similares a los observados en nuestro estudio.

La adición de cultivos iniciadores o bioconservadores a los embutidos crudos curados no parece afectar al desarrollo de levaduras y mohos. Palumbo *et al.* (1976) no observaron diferencias entre embutidos adicionados de un cultivo iniciador de bacterias lácticas y embutidos sin inocular.

III. 4. 11. Otros microorganismos patógenos

La investigación de microorganismos de los géneros *Salmonella* y *Shigella* en los embutidos analizados proporcionó resultados negativos. Los análisis realizados en las distintas etapas de la maduración confirmaron la ausencia de estos microorganismos. Por tanto, todos los embutidos analizados cumplen la Norma de Calidad Microbiológica que establece como requisito la ausencia de *Salmonella/Shigella* en 25 g de muestra (BOE, 1977).

Idénticos resultados se obtuvieron en la investigación para detectar la presencia de *Listeria monocytogenes* en los embutidos. Ninguna de las muestras analizadas resultó positiva al enriquecimiento realizado sobre medios de cultivos

selectivos. Aunque la Legislación Alimentaria actual no establece ningún requisito sobre la presencia o ausencia de este microorganismo en los embutidos crudos curados, los recientes casos de intoxicación han creado cierta alarma social que obliga a investigar su posible presencia en este tipo de alimento. Este microorganismo es halotolerante y capaz de crecer en medios ácidos por lo que puede adaptarse bien a las condiciones que reinan en los embutidos crudos curados. Sin embargo, los porcentajes de contaminación de estos alimentos por *L. monocytogenes* son mínimos (Benezet *et al.* , 1993).

Debido a las condiciones de bajo pH y a_w en el embutido crudo curado, los microorganismos de estos géneros ven muy dificultado su desarrollo, por lo que no es frecuente la aparición de casos de salmonelosis o listeriosis por consumo de embutidos crudos curados. La sal y el nitrito juegan un importante papel en la inhibición de *Salmonella/Shigella* en los primeros estadios de la fermentación cuando el pH es aún superior a 5,3. Schillinger y Lücke (1989a) comprobaron que elaborando embutidos con un bajo contenido de sal (sólo el 2 %) y 40-70 ppm de nitrito (la mitad de la cantidad usada normalmente), se podían obtener productos microbiológicamente seguros si se conseguía reducir el pH hasta valores inferiores a 5,3 en un plazo de 1-2 días, a una temperatura de 20° C. Para ello era necesario utilizar cepas lácticas con capacidad para producir ácido rápidamente, como *Lactobacillus sake*, o bien, mediante la adición de acidulantes artificiales como la glucono-delta-lactona (Lücke, 1994). En cuanto a la listeria, es sensible a diversas bacteriocinas formadas por bacterias ácido lácticas, incluidas algunas cepas involucradas en la fermentación de embutidos. Schillinger *et al.* (1991) probaron el efecto de una cepa de *Lactobacillus sake* productora de bacteriocinas sobre *L. monocytogenes* en la masa cruda de un embutido, y la compararon con el efecto de otra cepa de *Lactobacillus sake* no formadora de bacteriocinas. Los resultados demostraron que la masa inoculada con la cepa bacteriocinogénica presentaba recuentos de *Listeria* una unidad

logarítmica menores. Resultados similares fueron obtenidos por Berry *et al.* (1990) estudiando el efecto de pediococos productores de bacteriocinas en los llamados embutidos de verano.

III. 5. ANALISIS MULTIDIMENSIONAL

III. 5. 1. Análisis de Componentes Principales. Parámetros físico-químicos.

En la Tabla 37 se muestran los parámetros físico-químicos que provocaron la mayor diferenciación entre los distintos lotes de salchichones ensayados. De igual forma, en la Figura 30 se representa el diagrama de componentes principales donde se agrupan los distintos parámetros.

Como se puede observar en la Tabla 37, al estudiar los factores de carga de la componente 1 podemos comprobar que a_w , mermas, índice de TBA, NNP, humedad y molalidad fueron los parámetros que más influyeron en la variabilidad de los distintos lotes de embutidos, y se correspondieron con un 50 % de la varianza total. En cuanto a la componente 2, ácido láctico, pH, NaCl, proteína, grasa y cenizas fueron los parámetros que originaron mayor variabilidad, explicando un 21,16 % más de la varianza total. Entre ambas componentes suman un 71,16 % de la variabilidad total de las muestras.

En la Figura 30 se puede apreciar como se agrupan estos parámetros en función de las dos componentes estudiadas. En el lado positivo de la componente 1 observamos que se agrupan índice de TBA, mermas, NNP y molalidad; todas estas variables muestran entre sí una correlación positiva altamente significativa ($p < 0,001$) y a su vez se relacionan de forma negativa con las variables humedad y a_w , que se localizan en el lado negativo de la componente 1, mostrando asimismo una correlación positiva entre sí. Con respecto a la componente 2, se

pueden observar también dos grupos muy definidos (Figura 30), en el lado positivo se encuentran todos los parámetros que se incluyen en la composición química bruta (proteína, grasa, cenizas y ácido lácticos) junto con el NaCl y en el lado negativo están el pH y los nitritos que se relacionan de forma negativa con las variables anteriores.

III. 5. 2. Análisis de Componentes Principales. Parámetros microbiológicos.

Se realizó este tipo de análisis con objeto de determinar, entre los recuentos microbianos, las fuentes de variación más importantes que han provocado la diferenciación entre los distintos lotes de embutidos analizados.

En la Tabla 38 se pueden observar los factores o vectores de carga sobre cada una de las dos componentes principales (en orden de importancia, según su influencia) correspondiéndose a las puntuaciones medias de los 9 parámetros microbiológicos estudiados en las diferentes modalidades ensayadas. Del mismo modo se muestra la varianza explicada por ambas componentes, siendo para la primera el 60,42% y para la segunda el 15,09%, lo que significa que explicarían el 75,51% de la variabilidad total de las muestras.

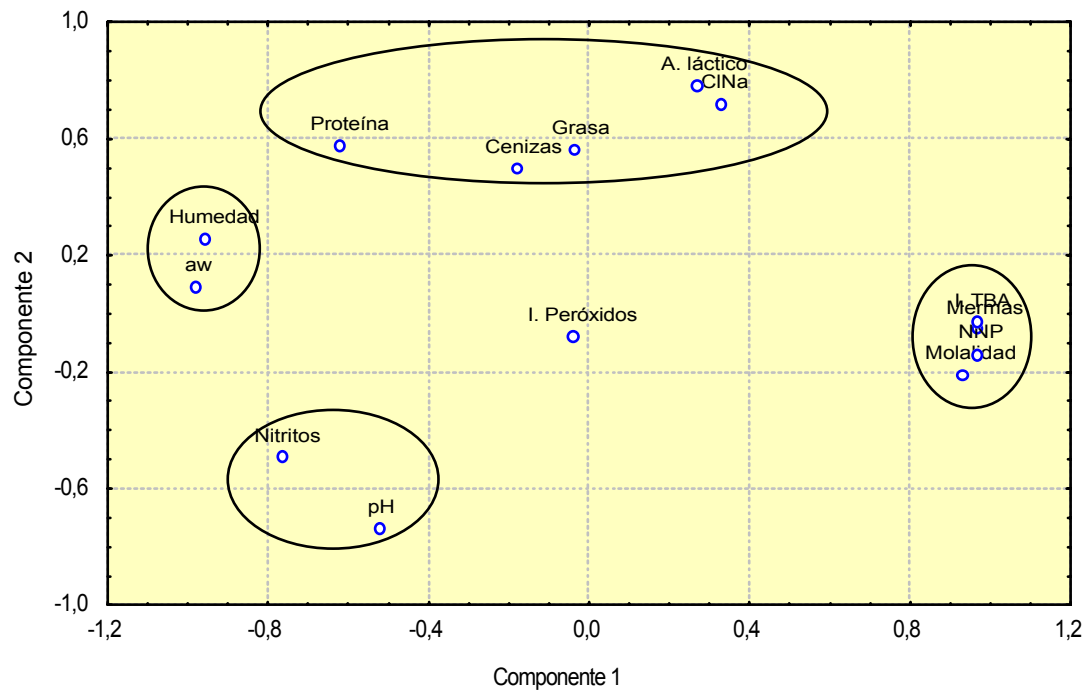
Atendiendo a la componente 1, se puede establecer que recuento total, estafilococos, enterobacterias y coliformes han sido la mayor fuente de variación entre embutidos con diferentes tratamientos. Además, como se observa en la Figura 31, el primer factor produce una diferenciación entre el grupo de microorganismos considerados como beneficiosos para la maduración (recuento total, lactobacilos, micrococos y estafilococos), los cuales siguen una evolución ascendente durante la maduración; y los microorganismos que constituyen la flora contaminante o indeseable (enterobacterias, coliformes, enterococos y *Staphylococcus aureus*), que siguen una evolución descendente, disminuyendo sus recuentos conforme avanza el proceso.

Tabla 37. Análisis de componentes principales (valores medios) de los parámetros físico-químicos de las partidas de salchichones.

Atributos	Factores de carga	
	1° componente principal	2° componente principal
Humedad	-0,9544 (5)	0,2581
Mermas	0,9697 (2)	-0,0513
pH	-0,5229	-0,7348 (2)
a_w	-0,9804 (1)	0,0920
NaCl	0,3287	0,7216 (3)
Molalidad	0,9276 (6)	-0,2084
Nitritos	-0,7641	-0,4927
Proteína	-0,6184	0,5767 (4)
NNP	0,9667 (4)	-0,1363
Grasa	-0,0353	0,5628 (5)
I. Peróxido	-0,0429	-0,0750
I. TBA	0,9695 (3)	-0,0315
Ac. Láctico	0,2650	0,7838 (1)
Cenizas	-0,1813	0,4991 (6)
Total	0,5000	0,2116

Los números entre paréntesis hacen referencia al orden en importancia de las variables en valor absoluto que más influyen en la diferenciación de los lotes de salchichones.

Figura 30. Diagrama de componentes principales entre parámetros físico-químicos (sin rotar).



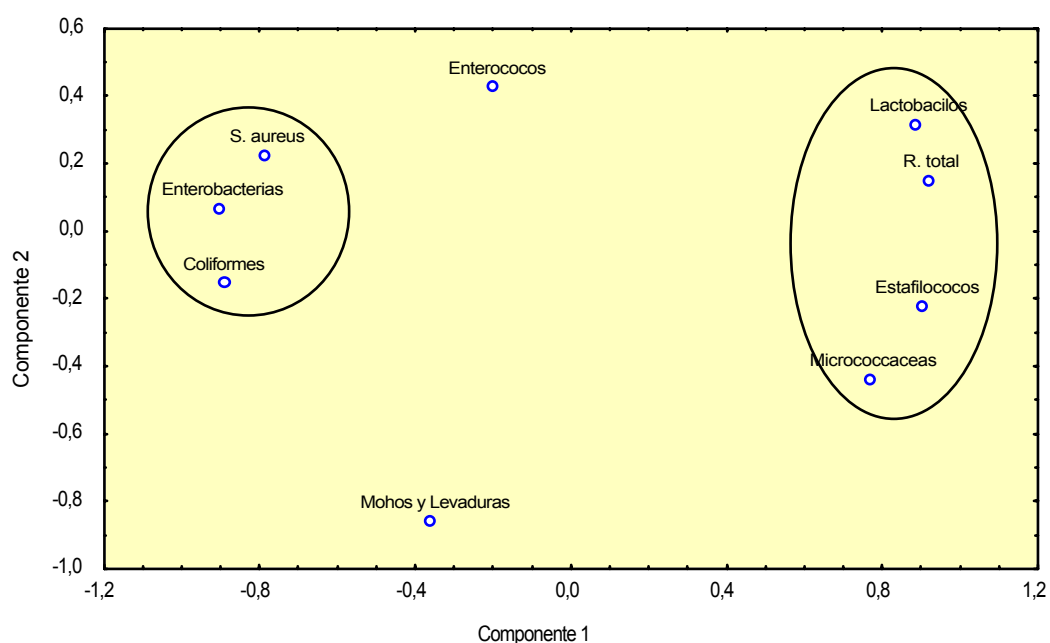
Al estudiar los factores de carga de la componente 2 podemos observar que los recuentos de mohos y levaduras, micrococáceas, enterococos y lactobacilos fueron las mayores fuentes de variación. Además esta componente permitió diferenciar dos grupos, como se puede apreciar en la Figura 31, quedaría en el lado positivo un grupo formado por lactobacilos y recuento total y en el lado negativo, otro compuesto por micrococáceas y estafilococos.

Tabla 38. Análisis de componentes principales de los valores medios de los parámetros microbiológicos de las partidas de salchichones.

Atributos	Factores de carga	
	1º componente principal	2º componente principal
R. total	0,9209 (1)	0,1486
Lactobacilos	0,8840	0,3139 (4)
Micrococáceas	0,7677	-0,4402 (2)
Estafilococos	0,9046 (2)	-0,2205
Enterobacterias	-0,9034 (3)	0,0671
Coliformes	-0,8917 (4)	-0,1534
Enterococos	-0,1997	0,4261 (3)
<i>S. aureus</i>	-0,7877	0,2234
Mohos y Levaduras	-0,3592	-0,8578 (1)
Total	0,6042	0,1509

Los números entre paréntesis hacen referencia al orden en importancia de las variables en valor absoluto que más influyen en la diferenciación de los lotes de salchichones.

Figura 31. Diagrama de componentes principales entre parámetros microbiológicos (sin rotar).



III. 6. EVALUACION DE LAS CARACTERISTICAS SENSORIALES

En la Tabla 39 se muestran las puntuaciones medias y las desviaciones típicas obtenidas para cada atributo sensorial en los diferentes lotes de salchichones analizados al final del proceso (día 32). Estos valores son la media de las tres partidas de embutidos realizadas (febrero de 1997, noviembre de 1997 y abril de 1998). A continuación se exponen los distintos atributos sensoriales agrupados teniendo en cuenta el órgano sensorial que preferentemente los detecta (figuras 32 a 35).

III. 6. 1. Percepciones visuales

En la Figura 32 se muestran las puntuaciones medias de aquellos atributos organolépticos relacionadas con la percepción visual; esto es, color, aspecto del corte, acortezamiento y facilidad de separación de la tripa.

III. 6. 1. 1. Color

La intensidad de color, como se muestra en la Figura 32a, fue mayor en los salchichones control (lote A) donde se alcanzaron las puntuaciones máximas de 6,62, y menor en los embutidos inoculados con el cultivo iniciador 2 (lote E) que mostraron una puntuación de 5,96. No obstante, las diferencias observadas entre los distintos lotes no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$), lo cual indica que el tipo de cultivo láctico adicionado no afectó al color del producto final. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Sanz *et al.* (1997b) que no observaron diferencias en el color entre embutidos inoculados con un cultivo mixto de *Lactobacillus sake* y *Staphylococcus carnosus* y los embutidos no inoculados.

No obstante, son numerosos los trabajos que demuestran la actividad nitrato reductasa de diferentes especies de *Staphylococcus* (Hartmann *et al.*,

1995; Flores y Toldrá, 1993) y concretamente de *Staphylococcus carnosus* (Poulanne *et al.*, 1977). Por otro lado, Hammes *et al.* (1990) detectaron un fuerte antagonismo entre ciertas cepas de *Lactobacillus sake* y *Micrococcus varians* cuando se inoculaban juntas en embutidos, originándose la supresión de la reducción del nitrato y de la reacción de enrojecimiento.

III. 6. 1. 2. Aspecto al corte

En la Figura 32b se muestran las puntuaciones medias otorgadas por los catadores al aspecto al corte de los distintos lotes de salchichones. Como se puede observar, los embutidos del lote A (control) mostraron el valor más elevado, 6,51, frente al resto de embutidos que no superaron el valor de 6,00. Esta valoración refleja que los salchichones sin inocular presentaron una mayor homogeneidad entre la mezcla de magro y grasa. No obstante, en el análisis estadístico no se apreciaron diferencias significativas entre los distintos lotes de embutidos ($p > 0,05$).

Los resultados obtenidos coinciden con los observados por González-Fernández *et al.* (1997) que tampoco obtuvieron diferencias en este atributo sensorial entre chorizos inoculados con cultivos iniciadores y sin inocular. No obstante, Flores *et al.* (1997) comprobaron que los embutidos inoculados con un cultivo mixto de *Lactobacillus sake* y *Staphylococcus carnosus* presentaban mejor aspecto al corte que los no inoculados, ya que el proceso de desecación se producía de forma más homogénea en los embutidos con cultivo iniciador.

El aspecto al corte se relacionó significativamente con el color ($r = 0,8323$, $p < 0,001$). Ambos parámetros pertenecen al grupo de atributos percibidos visualmente y está relación es lógica ya que los embutidos que presenten mejor color van a mostrar también un mejor aspecto del corte y viceversa. También se relacionó con la aceptabilidad general ($r = 0,5602$;

$p < 0,01$) que es un parámetro que puede estar relacionado con todos los demás, ya que cualquier atributo puede aumentar o disminuir la apreciación global del embutido.

III. 6. 1. 3. Acortezamiento

La aparición de una corteza exterior en el embutido es un defecto que se produce como consecuencia de una cinética del proceso de desecación incorrecta, bien debido a la aplicación de temperaturas excesivamente elevadas, por condiciones de humedad relativa muy bajas o por una excesiva velocidad del aire.

Como se puede observar en la Figura 32c, los catadores detectaron un ligero acortezamiento en los embutidos evaluados, que fue menos acusado en los salchichones inoculados con el cultivo iniciador 2 (lote E), donde no llegó a superar el valor de 5,80. Las diferencias observadas entre los distintos lotes de embutidos no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$), por lo que tampoco se puede asumir que la adición de un aditivo láctico u otro afecte a la formación de corteza exterior.

No obstante, Flores *et al.* (1997) observaron que en embutidos inoculados con cultivos iniciadores mixtos, donde el proceso de desecación se producía de forma homogénea, la aparición de corteza exterior era menor que en embutidos que no habían sido inoculados.

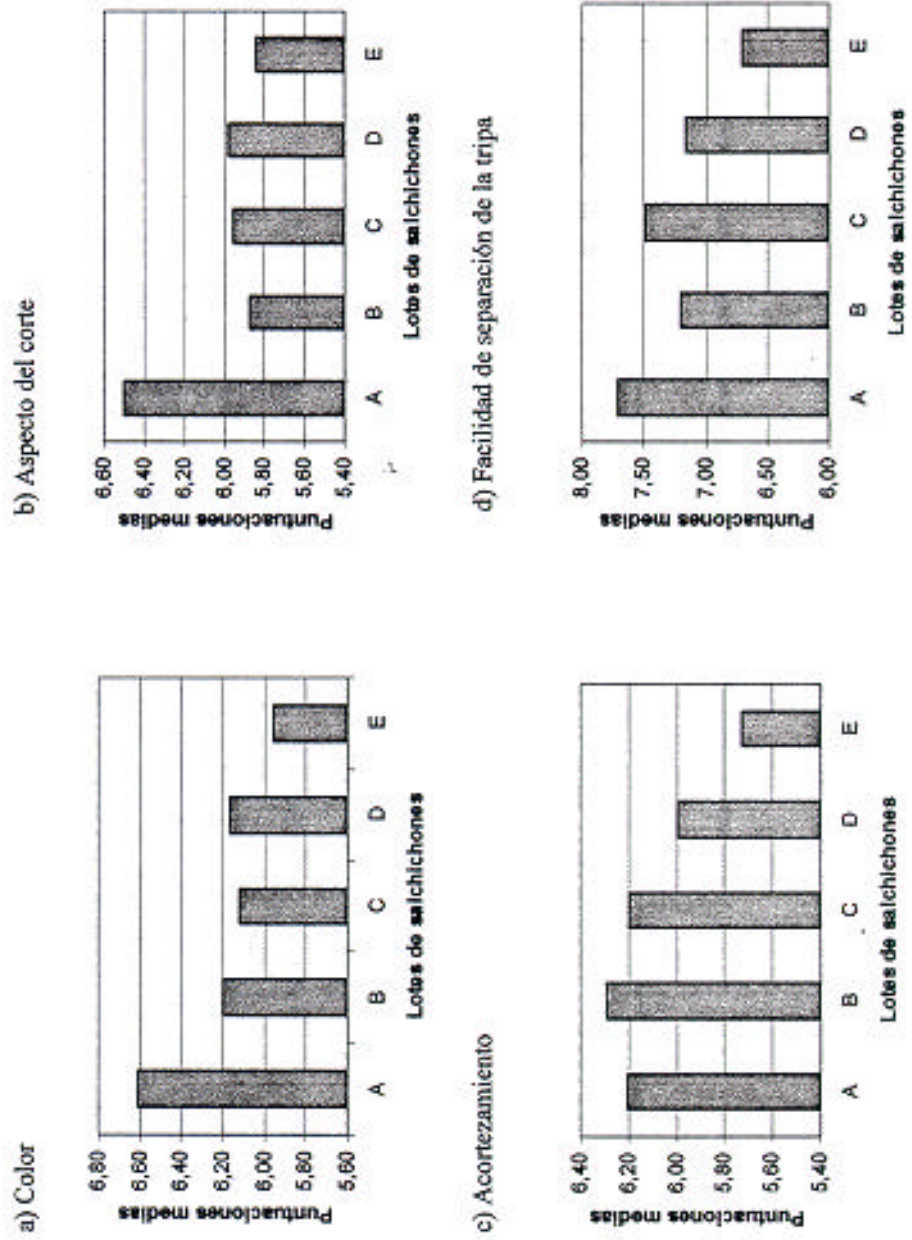
III. 6. 1. 4. Facilidad de separación de la tripa

La aparición de tripas totalmente desprendidas de la masa cárnica así como una excesiva adhesividad, son dos defectos que pueden aparecer en el embutido fruto de un proceso de desecación inadecuado.

Tabla 39. Valores medios y desviaciones típicas de las puntuaciones otorgadas a cada atributo sensorial en los diferentes lotes de salchichones analizados.

	A	B	C	D	E
Color	6,62±0,26	6,20±0,21	6,12±0,45	6,17±0,15	5,96±0,14
Aspecto del corte	6,51±0,14	5,87±0,10	5,95±0,60	5,98±0,62	5,84±0,06
Acortezamiento	6,20±0,20	6,29±0,21	6,20±0,21	6,00±0,53	5,73±0,48
Facilidad de separación de la tripa	7,71±0,45	7,20±0,99	7,49±0,29	7,17±0,83	6,70±0,78
Intensidad de olor	6,54±0,25	6,01±0,20	6,22±0,18	5,70±0,47	5,68±0,68
Presencia de olores extraños	1,69±0,12	1,94±0,24	2,16±0,48	1,74±0,20	1,67±0,14
Intensidad de sabor	6,52±0,21	6,20±0,32	6,26±0,44	6,35±0,40	6,21±0,42
Sabor ácido	4,18±0,11	3,75±0,42	4,41±0,42	4,38±0,55	3,97±0,46
Sabor picante	5,41±0,18	5,25±0,23	5,25±0,62	5,39±0,71	5,60±0,17
Presencia de sabores extraños	1,94±0,27	1,95±0,21	2,06±0,01	1,73±0,23	1,85±0,34
Dureza	5,03±0,43	4,84±0,08	4,44±0,67	5,20±0,06	5,20±0,29
Jugosidad	6,59±0,52	6,16±0,45	6,21±0,03	5,75±0,58	5,84±0,29
Aceptabilidad general	6,56±0,13	6,00±0,12	5,87±0,59	5,97±0,26	5,86±0,13

Figura 32. Puntuaciones medias de los atributos relacionados con las percepciones visuales en los salchichones analizados al final de la maduración.



La evaluación de este atributo se realizó con la misma escala que los demás, e interpretamos que puntuaciones inferiores a 5 implican cierta dificultad en la retirada de la tripa, mientras que puntuaciones superiores a cinco nos indicarían lo contrario.

En la Figura 32d podemos observar que los catadores otorgaron a todos los embutidos una puntuación superior a 6. Los embutidos que presentaron mayor facilidad para separar la tripa fueron los de los lotes A, B, C y D, con valores superiores a 7; mientras que el lote E mostró los valores menores. El análisis estadístico de los resultados nos permitió comprobar que las diferencias entre lotes eran significativas ($p < 0,05$), siendo los valores hallados para el lote E, significativamente menores que los hallados para el resto de lotes.

La mayor o menor facilidad de separación de la tripa depende fundamentalmente del grado de secado y de cómo se haya realizado el proceso de desecación, es decir de la cinética del proceso. Si la desecación no es suficiente y el producto queda poco curado, la dificultad al retirar la tripa será mayor que en productos más desecados, donde incluso puede quedar ligeramente despegada de la masa cárnica. Otro factor que influye en este atributo es el tipo de tripa utilizada; Roncalés (1994) comprobó que los embutidos elaborados con tripa artificial presentaban mayor facilidad para separarla que otros en los que se había utilizado tripa natural.

Teniendo en cuenta que los salchichones analizados en este estudio fueron embutidos con tripa de colágeno y que no se observaron diferencias en cuanto al contenido de humedad del producto, las diferencias existentes entre los lotes podrían deberse a otros factores como la ubicación de los embutidos en la cámara de maduración controlada. Es posible, que las localizaciones más externas pudieran favorecer una mayor desecación exterior de estas piezas, con lo cual se favorecería la facilidad de retirada de la tripa de las mismas.

III. 6. 2. Percepciones olfativas

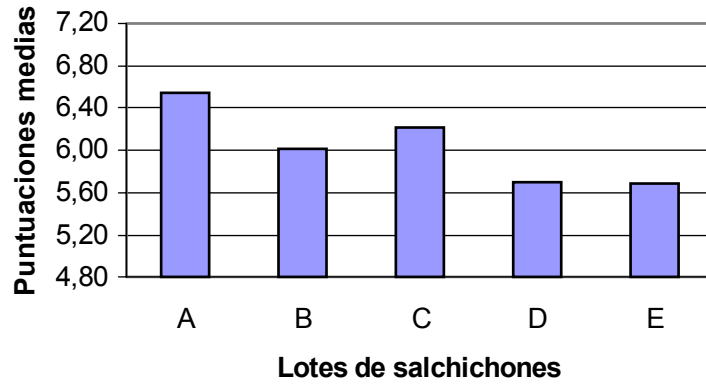
La intensidad de olor y la presencia de olores extraños son los dos atributos incluidos dentro de las percepciones olfativas que se evaluaron en este trabajo. En la Figura 33 se representan gráficamente los valores medios obtenidos para estos atributos.

III. 6. 2. 1. Intensidad de olor

En la Figura 33a se observa que las menores puntuaciones las obtuvieron los embutidos inoculados con los cultivos iniciadores, lotes D y E; que mostraron valores de 5,70 y 5,68, respectivamente. Por otro lado, los embutidos control y adicionados de bioconservadores, lotes A, B y C, fueron los que mostraron los valores más altos, superiores a 6,00. Sin embargo en el análisis estadístico realizado, no se observaron diferencias entre lotes ($p > 0,05$). Lo cual, coincide con los resultados observados por Sanz *et al.* (1997b) que no obtuvieron diferencias en la evaluación del aroma ($p > 0,05$) entre embutidos inoculados con un cultivo mixto de *Lactobacillus sake* y *Staphylococcus carnosus* y embutidos sin inocular. No obstante, otros autores como Lücke (1985) defienden la contribución de las micrococáceas a la formación del aroma de los embutidos crudos curados, y por tanto, que los productos que hayan sido inoculados con estos microorganismos desarrollaran un aroma más intenso que los no inoculados.

Edwards *et al.* (1991) estudiaron la presencia de sustancias volátiles, responsables del aroma de los embutidos, en el salchichón madurado, así como el efecto de la adición de microorganismos (una mezcla de *Lactobacillus* homofermentativos y *Micrococcus* lipolíticos y no lipolíticos) en la formación de volátiles en dicho embutido. En el producto madurado detectaron una mezcla

a) Intensidad de olor



b) Presencia de olores extraños

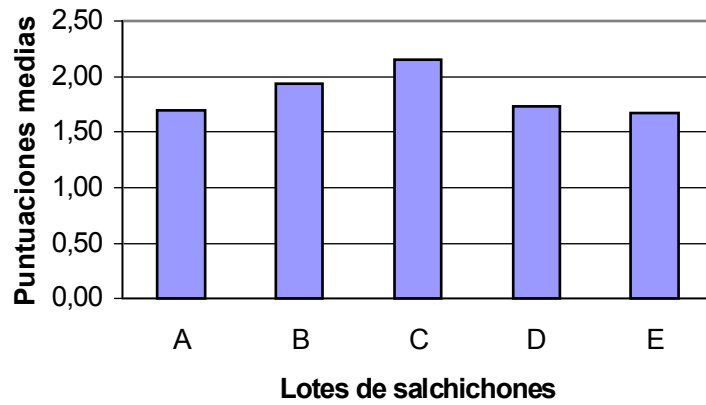


Figura 33. Puntuaciones medias de los atributos relacionados con las percepciones olfativas al final de la maduración.

compuesta fundamentalmente por ésteres etílicos y restos de aldehídos, cetonas y alcoholes. Por otra parte, la adición de los microorganismos citados anteriormente, ocasiona la aparición de ésteres a los 20 días de maduración, hecho que no ocurre en las muestras estériles sin inocular, ni en las desarrolladas con flora natural. Los citados autores llegan a la conclusión de que los ésteres son componentes mayoritarios del salchichón y que probablemente los microorganismos estén implicados en su formación.

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. También, González-Fernández *et al.* (1998), en chorizos inoculados con *Lactobacillus sake*, obtuvieron puntuaciones en el aroma mayores que en los embutidos control.

Aunque muchos trabajos subrayen la contribución de la actividad enzimática microbiana en el desarrollo del aroma del embutido (Simonetti *et al.*, 1983; Lücke, 1987; Nyckas y Arkoudelos, 1990) en otros muchos se afirma que esta actividad no es esencial (Comi *et al.*, 1992; Stahnke, 1995b; Montel *et al.*, 1996) y que los aminoácidos precursores de los compuestos aromáticos, así como los ácidos grasos necesarios para la formación del aroma proceden principalmente de la actividad proteolítica y lipolítica de las enzimas tisulares endógenas (Verplaetse, 1994). Una muestra de estas investigaciones fueron las llevadas a cabo por Montel *et al.* (1996) que inocularon cepas de *Staphylococcus* sp. con distinta capacidad lipolítica y comprobaron que los embutidos que presentaron mayor intensidad en el aroma fueron aquellos que habían sido inoculados con las cepas menos lipolíticas.

La intensidad de olor presentó una correlación positiva con la facilidad de separación de la tripa ($r = 0,7567$; $p < 0,001$), con la jugosidad ($r = 0,7179$; $p < 0,001$) y con la aceptabilidad general ($r = 0,6803$; $p < 0,002$). 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.

III. 6. 2. 2. Presencia de olores extraños

Las puntuaciones obtenidas de la valoración sensorial de este atributo se muestran en la Figura 33b. En este caso la interpretación de los datos es inversa, es decir, los jueces valoraron con puntuación inferior los embutidos en los que no se apreciaban olores extraños. Como se puede observar todos los lotes de salchichones muestran una puntuación que apenas supera el valor de 2, esta puntuación es mínima y no es representativa de la presencia de olores anormales en los embutidos. En el análisis estadístico de los resultados no se estimaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los distintos lotes de embutidos.

Los olores desagradables a rancio o pútrido, generalmente están asociados a la presencia de hexanal en el embutido, un metabolito procedente de la oxidación de las grasas (Shahidi *et al.*, 1987). Garriga *et al.* (1996) observaron que embutidos inoculados con cepas de *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus curvatus* y *Lactobacillus plantarum* mostraban menores puntuaciones en la presencia de olores extraños frente a los embutidos control, estos autores asociaron la presencia de olores anormales a una elevada producción de sulfuro

de hidrógeno que puede estar relacionado con un mayor recuento de enterobacterias, lo cual origina una depreciación de la aceptabilidad general del producto. Asimismo, García-Regueriro *et al.* (1998) detectaron menores concentraciones de hexanal en fuets inoculados con *Staphylococcus xylosus* frente a los embutidos control, que se mostraron más susceptibles a la oxidación lipídica, y afirman que la estabilidad de la oxidación lipídica en este tipo de productos curados podría conseguirse mediante la utilización de cultivos iniciadores.

Esto ya había sido observado por Berdagué *et al.* (1992) que comprobaron que los embutidos inoculados con una mezcla de *Staphylococcus carnosus* y *Lactobacillus sake* presentaban menor olor a rancio que los no inoculados, además afirmaron que el tipo de cultivo iniciador añadido a un embutido tenía gran influencia en la composición y características sensoriales que contribuyen al aroma de los embutidos, y que el aroma de estos puede ser modulado mediante la combinación de distintos microorganismos. Posteriormente, Talón *et al.* (1998) han comprobado que la presencia de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa en embutidos crudos curados contribuye a la inhibición de la oxidación de los ácidos grasos insaturados. Basándose en esta afirmación, Barrière *et al.* (1998) han demostrado que la inoculación de *Staphylococcus xylosus* y *Staphylococcus carnosus*, portadores de estas enzimas, como cultivos iniciadores en embutidos crudos curados favorece la formación del aroma inhibiendo la oxidación.

No obstante, Mateo y Zumalacárregui (1996a) afirman que la autooxidación de los lípidos en los embutidos se produce de forma dispar dependiendo de la intervención de distintos factores antioxidantes y prooxidantes como el ahumado, las especias, los nitritos, el grado de anaerobiosis, etc. Mientras que Berdagué *et al.* (1993) atribuye el 60 % del aroma a la presencia de compuestos volátiles, Berger *et al.* (1990) y Mateo y Zumalacárregui (1996a), en

sendos estudios, no han detectado estos compuestos ni en salami ni en chorizo, respectivamente.

III. 6. 3. Percepciones gustativas

En la Figura 34 se representan las puntuaciones otorgadas por los catadores a los distintos atributos relacionados con el gusto, donde se incluyen: intensidad de sabor, sabor ácido, sabor picante y presencia de sabores extraños.

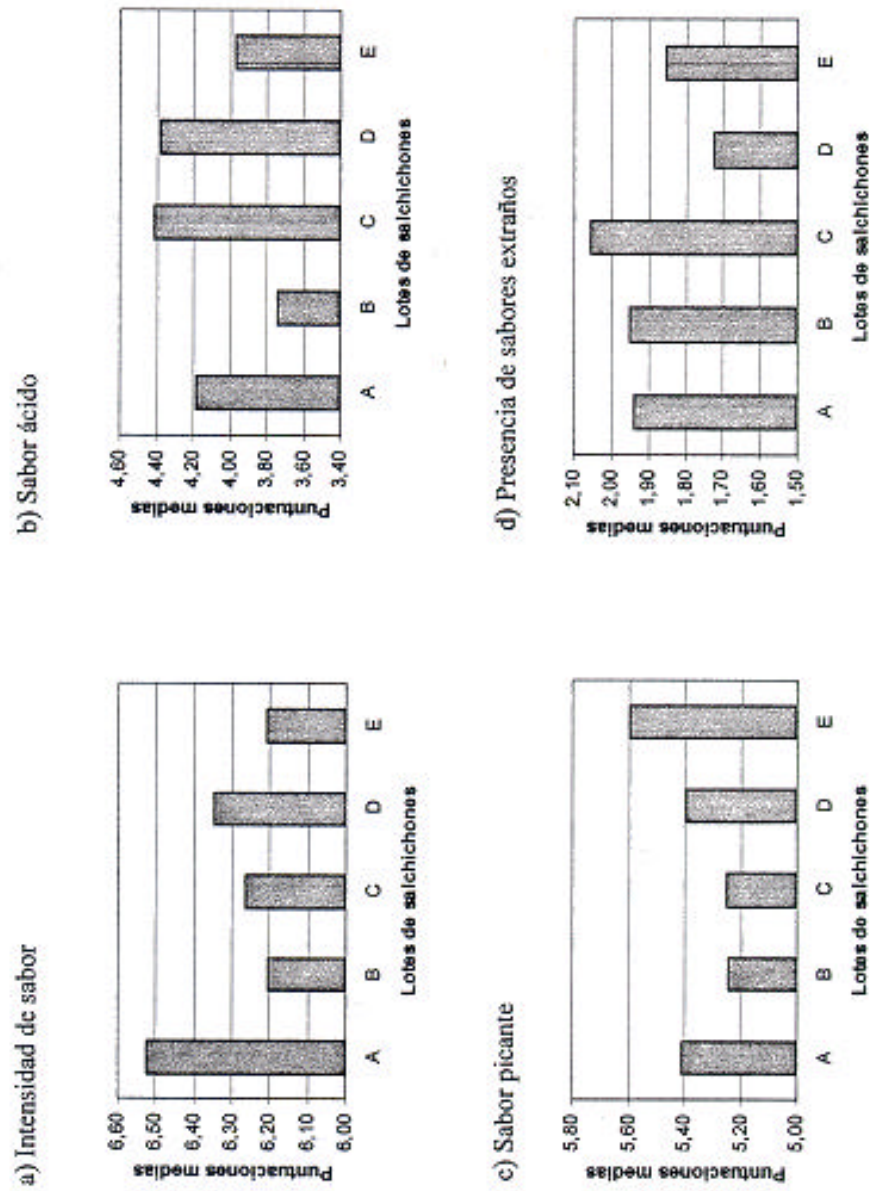
III. 6. 3. 1. Intensidad de sabor.

La Figura 34a muestra las puntuaciones medias para la intensidad de sabor otorgadas por los catadores para los distintos lotes de embutidos analizados. Pese a que los embutidos control presentaron mayores puntuaciones, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$), por lo que se puede afirmar que la adición de un tipo u otro de aditivo láctico a los embutidos no afectó significativamente a la percepción final del sabor.

Estos resultados coinciden con los observados por Flores *et al.* (1997) y Sanz *et al.* (1997b) que tampoco encontraron diferencias entre el sabor de embutidos inoculados con un cultivo mixto de *Lactobacillus sake* y *Staphylococcus carnosus* y los embutidos control. Idénticos resultados obtuvieron Kenneally *et al.* (1998b) al inocular embutidos con cultivos mixtos de *Lactobacillus sake* y *Staphylococcus xylosum*. 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 (Pérez *et al.*, 1992; González-Fernández *et al.*, 1997).

Los aminoácidos son los compuestos que generalmente están asociados con la estimulación de las sensaciones gustativas. La presencia de estas sustancias, fruto de la hidrólisis de las proteínas, aportará más o menos sabor a

Figura 34. Puntuaciones medias de los atributos relacionados con las percepciones gustativas en los salchichones analizados al final de la maduración



estos embutidos (Mateo y Zumalacárregui, 1996b). Según Verplaetse (1994) en los embutidos con un pH más ácido (con cultivos iniciadores) tienen un mayor contenido de péptidos y aminoácidos, lo cual repercute en la intensidad de sabor. Sin embargo, Flores *et al.* (1997) comprobaron que un mayor contenido en péptidos y aminoácidos no afecta a la evaluación sensorial del sabor. Verplaetse *et al.* (1992) han relacionado las reacciones proteolíticas con el desarrollo del sabor pero, tal como apuntaron Dainty y Bloom (1995), no existe ninguna evidencia que confirme esta opinión, ya que está basada en las propiedades sensoriales de péptidos y aminoácidos, los cuales incrementan durante el proceso de curación.

III. 6. 3. 2. Sabor ácido

El sabor ácido es el segundo atributo relacionado con el flavor que se evaluó, las puntuaciones medias obtenidas para cada uno de los lotes de salchichones analizados se muestran en la Figura 34b.

Como puede observarse, los salchichones que los catadores consideraron menos ácidos fueron los inoculados con el bioconservador 1 (lote B), que obtuvo un valor máximo de 3,75, seguido de los embutidos inoculados con el cultivo iniciador 2 (lote E) que presentaron un valor de 3,97. En un término medio fueron evaluados los salchichones control (lote A) con un valor próximo a 4,20 y, finalmente, las puntuaciones más altas fueron para los lotes C y D que alcanzaron valores de 4,41 y 4,38, respectivamente. Pese a estas diferencias, el análisis estadístico demostró que no eran significativas ($p > 0,05$) y, en contra de lo que cabría esperar, se puede establecer que la adición de cultivos iniciadores a los embutidos analizados no ha afectado de forma sensible al sabor ácido de los mismos, ya que las puntuaciones en todos los casos fueron inferiores a 5.

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 (Macleod, 1986; Haefeli y Glaser, 1990), y ácidos grasos libres. Otros autores también han apuntado la contribución de determinados aldehídos y cetonas en la formación del aroma ácido (Bucharles y Girard, 1983). Todo esto nos indica que la detección de este sabor en los embutidos se debe a la participación de distintos compuestos sápidos y aromáticos.

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 distintos autores (Bucharles *et al.*, 1984; Ramihone *et al.*, 1988; Pérez *et al.*, 1992; González-Fernández *et al.*, 1997). Esta acentuación del sabor ácido está asociado 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 (Verplaetse *et al.*, 1994). Para evitar estos casos es necesario encontrar un punto de equilibrio entre la producción de ácido y el sabor, para ello se debe intensificar la producción de amoníaco que neutralice la acidez final, de esta forma se incrementa el sabor del embutido. 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 (Mateo y Zumalacárregui, 1996b).

No obstante, los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los realizados por otros autores, que tampoco encontraron diferencias significativas entre embutidos que habían sido inoculados con cultivos lácticos de otros sin inocular (Garriga *et al.*, 1996; Keneally *et al.*, 1998).

III. 6. 3. 3. Sabor picante

En la Figura 34c se muestran las puntuaciones medias obtenidas por los distintos lotes de embutidos en la evaluación del sabor picante. Como se puede observar los embutidos inoculados con el cultivo iniciador 2 (lote E) mostraron las puntuaciones más altas con un valor de 5,60. En cambio, los embutidos adicionados de bioconservadores (lotes B y C) mostraron el valor más bajo (5,25) y en un término medio quedaron el lote control (lote A) y el inoculado con el cultivo iniciador 1 (lote D), con puntuaciones próximas a 5,40. Tras el análisis estadístico de los resultados se comprobó que estas diferencias no eran significativas ($p > 0,05$), sin embargo, teniendo en cuenta que todos los embutidos fueron elaborados con la misma formulación, las ligeras variaciones podrían deberse a la utilización de los distintos tipos de aditivos lácticos. Atendiendo a esta premisa se podría establecer que la adición de bioconservadores reduce ligeramente la aparición del sabor picante.

El sabor picante en los embutidos crudos curados ha estado asociado con la presencia de determinados aldehídos, ácidos, alcoholes y esteres procedentes de aminoácidos (Brenand *et al.*, 1989; Pelosi, 1989; Berdague *et al.*, 1991). No obstante, la pimienta, especia tradicionalmente utilizada en la elaboración de salchichones, constituye también una fuente importante de compuestos volátiles (Berger, 1990; Croizet *et al.*, 1992; Johansson *et al.*, 1994). El flavor de las especias es originado por los aceites esenciales y, en algunos casos, por compuestos pungentes como la piperina o capsaicina. Entre los componentes de los aceites esenciales destaca la presencia de los terpenos, fénilpropanos y un amplio grupo de sustancias aromáticas como aldehídos, cetonas, alcoholes, fenoles, etc. (Mateo y Zumalacárregui, 1996a). Croizet *et al.* (1992) determinaron los volátiles de un embutido francés y su evolución a lo largo de la maduración, encontrando numerosos compuestos con origen en la propia carne, en la pimienta y en el ajo. De entre los procedentes de la carne destacan los

aldehídos, alcoholes, ésteres e hidrocarburos, de la pimienta los terpenos y del ajo los compuestos sulfurados.

III. 6. 3. 4. Presencia de sabores extraños

La presencia de sabores extraños es el último atributo relacionado con las percepciones gustativas evaluado en este estudio. Las puntuaciones medias otorgadas por los catadores para los distintos lotes de embutidos analizados se muestran en la Figura 34d.

Al igual que sucedió con el olor, la presencia de sabores extraños apenas si superó el valor de 2, lo cual es mínimo teniendo en cuenta que la escala está puntuada hasta 10. De los embutidos analizados, sólo los del lote C, rebasaron el valor de 2, quedando el resto por encima de 1,5. Las diferencias entre lotes, como se puede apreciar, son mínimas y en el análisis estadístico se confirmó que éstas no son significativas ($p > 0,05$).

La presencia de aminoácidos sulfurados en el embutido es la principal responsable de la aparición de sabores extraños (Mateo y Zumalacárregui, 1996b), aunque también pueden intervenir aldehídos, ácidos, alcoholes y ésteres procedentes de otros aminoácidos que proporcionan un indeseable sabor a rancio (Brenand *et al.*, 1989; Pelosi, 1989; Berdagué *et al.*, 1991). Asimismo, la producción de sulfuro de hidrógeno puede afectar al sabor de los embutidos, Garriga *et al.* (1996) encontraron que embutidos no inoculados con cultivos iniciadores mostraron mayor presencia de sabores extraños que los inoculados. Estos autores sospechan que la anormal producción de sulfuro de hidrógeno puede estar relacionada con una elevada concentración de enterobacterias.

III. 6. 4. Percepciones hápticas y aceptabilidad general

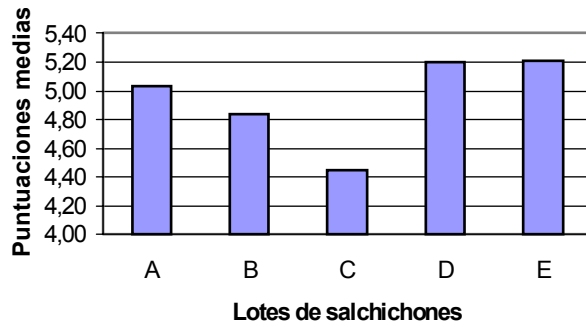
La dureza y la jugosidad son los dos atributos incluidos dentro de las percepciones hápticas que se evaluaron en este trabajo. En la figura 35 se representan gráficamente los valores medios obtenidos para estos atributos y para la aceptabilidad general.

III. 6. 4. 1. Dureza

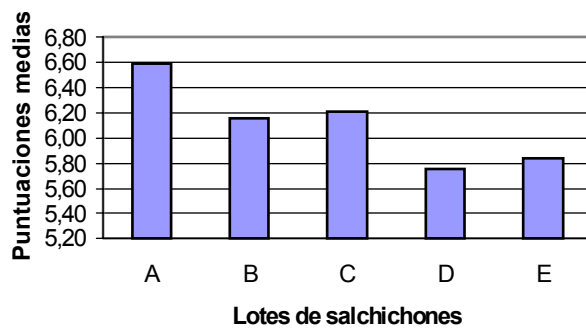
Las puntuaciones medias otorgadas por los catadores en la valoración de la dureza se muestran en la Figura 35a. Puede observarse que los embutidos inoculados con los cultivos iniciadores comerciales (lotes D y E) presentaron el valor más alto de dureza, 5,20; seguido por el lote control (lote A) con una puntuación de 5,03. El resto de embutidos mostraron valores entre 4,40 y 4,80, correspondiendo la puntuación más baja al lote adicionado del bioconservador 1 (lote C). Pese a las diferencias observadas, estas no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$), por lo que no se puede establecer que la adición de uno u otro aditivo láctico modifique sensiblemente la dureza del producto final.

Las ligeras diferencias en la dureza obtenidas en este trabajo se muestran coincidentes con los resultados observados por González-Fernández *et al.* (1997) que comprobaron que los embutidos inoculados con lactobacilos presentaban mayor dureza que los embutidos no inoculados. Estos mismos autores en un trabajo posterior con chorizos, confirmaron que los embutidos más duros eran aquellos que habían sido adicionados de cultivos iniciadores con respecto a los embutidos sin inocular. 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, el rápido descenso del pH que se produce cuando se utilizan cultivos lácticos afecta positivamente a la textura del

a) Dureza



b) Jugosidad



c) Aceptabilidad general

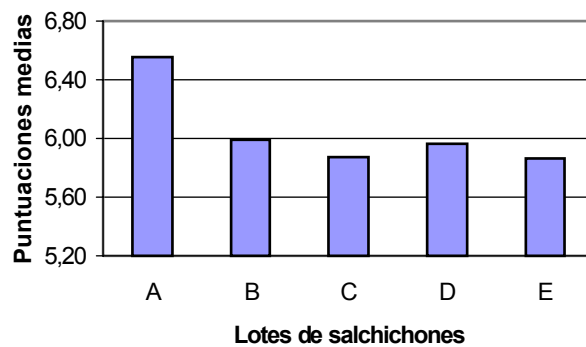


Figura 35. Puntuaciones medias de los atributos relacionados con las percepciones hápticas y aceptabilidad general al final de la maduración.

producto, ya que el bajo pH afecta a la solubilidad de las proteínas. Esto ya había sido observado por Dainty y Blom (1995) que aseguran que es el ácido láctico el que actúa sobre la “sensación táctil” de los embutidos.

III. 6. 4. 2. Jugosidad

Las puntuaciones medias otorgadas por los catadores a la jugosidad de los salchichones analizados se muestran en la Figura 35b. Como se puede apreciar, los embutidos sin inocular (lote A) mostraron los valores más altos de jugosidad, próximos a 6,60; mientras que los embutidos inoculados con los cultivos iniciadores comerciales (lotes D y E) presentaron los valores más bajos, cercanos a 5,80. Los salchichones adicionados de bioconservadores se mantuvieron en un término medio, con valores de jugosidad que rondaron 6,20. En este caso sí se pudieron establecer diferencias significativas entre los lotes de embutidos A y D, determinándose que los valores de jugosidad para embutidos control fueron significativamente más altos ($p < 0,05$) que los inoculados con el cultivo comercial 1. Estos resultados coinciden con los observados por otros autores que también observaron que los embutidos inoculados con cultivos de bacterias lácticas se mostraban en la evaluación sensorial menos jugosos que los embutidos sin inocular (Sharma y Mukhopadhyay, 1995; González-Fernández *et al.*, 1997).

La jugosidad es un atributo estrechamente relacionado con el contenido en agua del producto, así como con el contenido en grasa, ya que ésta induce a la salivación. Pérez *et al.* (1992), en un estudio con embutidos inoculados con lactobacilos, comprobaron que los embutidos control eran más jugosos que los inoculados y afirmaron que esto era debido al mayor contenido en agua que presentaban los embutidos control en el momento del análisis sensorial. En nuestro caso podemos observar, figuras 35a y 35b, que los embutidos inoculados con los cultivos iniciadores comerciales (lotes D y E) que presentaron las

mayores puntuaciones en la dureza son también los menos jugosos. Asimismo, los embutidos de los lotes D y E, mostraron los menores contenidos de agua al final de la maduración (tabla 13), lo cual justificaría la menor jugosidad en estos salchichones.

III. 6. 4. 3. Aceptabilidad general

Como se puede apreciar en la Figura 35c, se percibe de forma evidente que los catadores mostraron preferencia por los embutidos control, lote A, que obtuvieron una puntuación de 6,59. El resto de lotes presentaron puntuaciones que oscilaron entre 5,86 y 6,00. Estas diferencias, no obstante, no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$), tal y como cabría esperar, por lo que no se puede establecer que la adición de aditivos lácticos a embutidos crudos curados influya negativamente en la aceptabilidad de estos por los consumidores.

Estos resultados son coincidentes con los observados por Kenneally *et al.* (1998a) que en un estudio con embutidos inoculados con microorganismos de distinta actividad lipolítica, observaron que no existían diferencias entre los embutidos inoculados y sin inocular. Asimismo, Hammes y Hertel (1996) inocularon embutidos con cepas de *Lactobacillus plantarum* y comprobaron que la elevada producción de ácido láctico por parte de los microorganismos originó productos muy ácidos que no fueron bien aceptados, en cambio los embutidos sin inocular consiguieron las mejores puntuaciones. 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 detrimento 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 instauró la flora láctica que predominó con respecto a las bacterias Gram negativas, evitando la presencia de defectos que deprecien su aceptación global.

IV. RESUMEN

IV. RESUMEN

En este trabajo se ha realizado un estudio comparativo sobre un típico embutido crudo curado, el salchichón “tipo casero”, que se elaboró con diferentes cultivos iniciadores y bioconservadores.

Para ello se fabricaron cinco lotes de embutidos de 42 piezas cada uno, dos de estos lotes se inocularon con cultivos iniciadores comerciales, otros dos con bioconservadores y otro, al que no se le adicionó nada, se consideró el lote control. Estos salchichones se maduraron en una cámara de maduración controlada durante 30 días. A lo largo de todo el proceso, se realizaron distintos análisis químicos y físico-químicos (composición química bruta, evolución de pH y a_w , cantidad de cloruro sódico, nitritos, NNP y evolución de los índices de oxidación de la grasa). También se estudiaron los distintos grupos de microorganismos, tanto los involucrados en la maduración como los alterantes y patógenos, con el fin de valorar la posible acción bioconservadora de los productos añadidos. Y finalmente se realizó una evaluación sensorial para definir las características organolépticas de los distintos lotes de salchichones y poder identificar las posibles diferencias que originaban la adición de uno u otro tipo de cultivo láctico.

En los resultados obtenidos no se aprecian diferencias significativas ($p > 0,05$) en la mayoría de los parámetros químicos y físico-químicos, a excepción del pH y el contenido de ácido láctico. Todos los embutidos analizados cumplieron la Norma de Calidad para salchichón de categoría extra. En cuanto a los parámetros microbiológicos, los salchichones inoculados con cultivos iniciadores comerciales mostraron recuentos de lactobacilos y micrococáceas significativamente más elevados ($p < 0,001$) que el resto de lotes. Asimismo, estos lotes de embutidos mostraron los menores recuentos de enterobacterias, coliformes y enterococos. Estos grupos microbianos también

fueron significativamente más bajos ($p < 0,001$) en los embutidos inoculados con uno de los bioconservadores (lote B). Con respecto a los atributos sensoriales no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los distintos lotes de salchichones. De estos resultados se puede deducir que, aunque los bioconservadores podrían utilizarse como un obstáculo más en la conservación de los embutidos crudos curados, no llegarían a reemplazar a los cultivos iniciadores en la dirección y orientación de la fermentación láctica.

IV. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

Primera. No se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los parámetros (proteína, grasa, cenizas y NaCl) cuando se añadía uno u otro tipo de cultivo láctico o bioconservador. La cantidad de proteína y grasa obtenida en los embutidos al final de la maduración se ajusta a la Norma de Calidad para salchichón de categoría extra.

Segunda. Según el contenido final de agua y las mermas determinadas, los productos analizados pertenecen al tipo “embutidos secos”. Asimismo, la humedad y las mermas no sufrieron variaciones, sin que llegáramos a apreciar diferencias entre los distintos lotes ($p > 0,05$). En cuanto a la a_w , ésta experimentó una evolución similar en todos los lotes de embutidos, decreciendo hasta valores próximos a 0,930. La ecuación utilizada para el cálculo de la a_w , sólo se ajustó a los datos experimentales en los primeros estadios de la maduración, causa por la cual no es recomendable su uso en las siguientes etapas.

Tercera. En los salchichones inoculados con los cultivos iniciadores, (lotes D y E), el pH alcanzó el valor de 5,2 tras el estufaje (día 3), mientras que en los lotes restantes no se alcanzó hasta los 9 ó 16 días. Por otro lado, las concentraciones de ácido láctico fueron significativamente superiores ($p < 0,001$) para los salchichones de los lotes D y E con respecto al resto. De ello, resulta evidente que los parámetros pH y cantidad de ácido láctico están relacionados ($p < 0,001$).

Cuarta. La concentración inicial de nitrito descendió durante la primera semana a niveles inferiores a 5 ppm. En el producto final las concentraciones de nitrito residual no superaron en ningún caso el límite máximo permitido por la Legislación Alimentaria Española.

Quinta. La utilización de distintos cultivos iniciadores y bioconservadores no modificaron el grado de oxidación de los lípidos de los salchichones, que fue determinado por el índice de peróxidos y el valor de TBA.

Sexta. Los recuentos de enterobacterias, coliformes y enterococos fueron significativamente menores ($p < 0,001$) en los embutidos inoculados con los cultivos comerciales (lotes D y E) que en el resto de embutidos. El lote B, inoculado con el bioconservador 1, mostró menores recuentos de coliformes y enterococos que los lotes A y C ($p < 0,001$).

Séptima. Los lactobacilos fueron el género mayoritario de bacterias lácticas identificado. Los salchichones inoculados con los cultivos iniciadores comerciales (lotes D y E) mostraron recuentos significativamente más elevados que el resto de los lotes ($p < 0,001$) durante toda la maduración. De igual forma, los recuentos de micrococáceas (micrococos y estafilococos) también fueron significativamente superiores ($p < 0,001$) en los salchichones de los lotes D y E.

Octava. Al final de la maduración, todos los salchichones analizados cumplían los criterios que exige la Norma Microbiológica en cuanto a la limitación de los microorganismos patógenos *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *E. coli* (BOE, 1977).

Novena. Los cultivos iniciadores y el bioconservador 1 presentaron cierta acción protectora contra microorganismos alterantes (enterobacterias, coliformes y enterococos) durante la maduración, lo cual podría indicar su utilización como un obstáculo más en la conservación de estos productos. No obstante, no parece conveniente reemplazar la utilización de los cultivos iniciadores por los bioconservadores, ya que la participación en la orientación de la fermentación es más segura y efectiva cuando se añaden los primeros.

Décima. Los atributos sensoriales de los salchichones no sufrieron diferencias significativas ($p > 0,05$) con la adición de uno u otro tipo de aditivo láctico.

VI. BIBLIOGRAFÍA

VI. BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Bar, N. M. y Harris, N. D. (1984). Inhibitory effect of *Lactobacillus bulgaricus* on psychrotrophic bacteria in associative cultures in refrigerated foods. *Journal of Food Protection* **47**, 61-64.
- Abee, T. (1995). Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiology Letters* **129**, 1-9.
- Aguirre, M. and Collins, M.D. (1993). Lactic acid bacteria and human clinical infection. *Journal of Applied Bacteriology* **75**, 95-107.
- AICE (1999). Asociación de Industrias de la Carne de España. *Estadística de producción de los elaborados cárnicos*. www.AICE.es.
- Alford, J.A., Smith, J.L. and Lilly, H.D. (1971). Relationship of microbial activity to changes in lipids of foods. *Journal Applied Bacteriology* **34**, 133-138.
- Al-Zoreky, N. (1988). Microbiological control of foods spoilage and pathogenic microorganisms in refrigerated foods. M.S. thesis, Oregon State University, Corvallis.
- Amstrong, H. (1996). Cultivos competitivos para carne fresca. *Carnica 2000. Guia Tecnológica*, pp. 134-138.
- Anders, R.J. and Milowski, A.L. (1987). A foodstuff containing a lactate salt. European Patent Application 230 122 A2.
- Anders, R.J., Cervený, J.G. and Milowski, A.L. (1989). Method for delaying *Clostridium botulinum* growth in fish and poultry. U.S. Patent 4,798,729.
- Andersen, G. y Ten Cate, L. (1965). Zuckerzusatz und pH-wert-senkung bei der Rohwurstherstellung. *Fleischwirtschaft* **56**, 549-552.
- Andersen, H.J., Ostdal, H. and Blom, H. (1995). Partial purification and characterization of a lipase from *Lactobacillus plantarum* Mf32. *Food Chemistry* **53**, 369-373.
- Andersen, S.J. (1992). Changes in the microflora during ripening of naturally mould-fermented sausages. *38th International Congress of Meat Science and Technology*. Clermont-Ferrand. France, pp. 767-769.
- Anderson, M.E., Huff, H.E., Naumann, H.D. and Marshall, R.T. (1988). Counts of six types of bacteria on lamb carcasses dipped or sprayed with acetic acid at 25° C or 55° C and stored vacuum packaged at 0° C. *Journal of food Protection* **51**, 874-877.
- Anderson, R. (1986). Inhibition of *Staphylococcus aureus* and spheroplasts of gram-negative bacteria and antagonistic compound produced by a strain of *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Food Technology* **3**, 149-160.
- Antequera, T. (1990). Evolución del componente lipídico durante la maduración del jamón de cerdo ibérico. *Tesis doctoral*, Universidad de Extremadura, Cáceres.
- Antequera, T., Lopez-Bote, C., Córdoba, J.J., García, C., Asensio, M.A., Ventanas, L., García-Reguero, J.A. y Díaz, I. (1992). Lipid oxidative changes in the processing of Iberian pig hams. *Food Chemistry* **45**, 105-110.
- AOAC. (1990). Official Methods of Analysis. 15th edition. *Association of Official Analytical Chemists*. Washington, DC.
-

- APHA. (1976). Recommended Methods for the microbiological examinations of foods. *American Public Health Association*. Washington. USA.
- APHA. (1985). Standard methods for the examination of dairy products. 15th ed. *American Public Health Association*. Washington. USA.
- APHA. (1992). Standard methods for the examination of dairy products. *American Public Health Association*. Washington. USA.
- Arihara, K., Cassens, R.G. and Luchansky, J.B. (1993). Characterization of bacteriocins from *Enterococcus faecium* with activity against *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* **19**, 123-134.
- Astiasarán, I., Lizarraga, T., Melgar, J., Santamaría, I., Villanueva, R. y Bello, J. (1990a). Estudio comparativo de las características del chorizo según la tecnología de elaboración empleada. *Alimentaria* **209**, 57-62.
- Astiasarán, I., Villanueva, R. and Bello, J. (1990b). Analysis of proteolysis and protein insolubility during the manufacture of some varieties of dry sausage. *Meat Science* **28**, 111-117.
- Bacus, J. (1984). Update: meat fermentation, 1984. *Food Technology* **38**, 59-63.
- Bantleon, A.D. (1987). *Lactobacillus sake* und *Lactobacillus curvatus* als starterorganismen für die rohwrurstreifung. Thesis, Universität Hohenheim.
- Barber, L.E. and Deibel, R.H. (1972). The effects of pH and oxygen tension on staphylococcal growth and enterotoxin production in fermented sausage. *Applied Microbiology* **24**, 891-895.
- Barefoot, S.F. and Klaenhammer, T.R. (1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* **45**, 1808-1815.
- Barefoot, S.F. and Klaenhammer, T.R. (1984). Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Antimicrobial Agents Chemother* **26**, 328-334.
- Barrière, C., Montel, M.C. and Talon, R. (1998). Production of catalase and superoxide dismutase by *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosus*. *44th International Congress of Meat Science and Technology*. Barcelona, Spain, pp. 794-795.
- Baxter, J., Gibba, P.A. and Blood, R.M. (1983). Lactic acid bacteria: Their role in food preservation. A literature survey. *The British Food Manufacturing Industries Research Association. Scientific and Technical Survey* **144**, 12-17.
- Belfrage *et al.* (1984). Citado por Toldrá *et al.*, 1992
- Bello, J. and Sánchez-Fuertes, M.A. (1995). Application of a mathematical model for the inhibition of *Enterobacteriaceae* and Clostridia during a sausage curing process. *Journal of Food Protection* **58**, 1345-1350.
- Bello, J. and Sánchez-Fuertes, M.A. (1997). Development of mathematical model to describe the acidification occurring during the ripening of dry fermented sausage. *Food Chemistry* **59**, 101-105.
- Bello, J., Larralde, J. y Saenz de Buruaga, M.I. (1974). Estudio de las modificaciones proteicas que tienen lugar durante la curación de algunos derivados cárnicos. 1: Curación del chorizo de Pamplona. *Anales de Bromatología* **26**, 195-210.
- Benezet, A., De la Osa, J.M., Botas, M., Olmo, N. y Florez, F.P. (1993). Investigación de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos. *Alimentaria* **247**, 19-23.
-

- Berdagué, J.L., Denoyer, C., LeQuéré, J.L. and Semon, E. (1991). Volatile components of dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **39**, 1257-1261.
- Berdagué, J.L., Monteil, P., Montel, M.C. and Talon, R. (1993). Effect of starter cultures on the formation of flavour compounds in dry sausages. *Meat Science* **35**, 275-287.
- Berdague, J.L., Montel, C., Talon, R. and Monteil, P. (1992). Influence of starter cultures on the volatile content and aroma of dry sausage. *38th International Congress of Meat Science and Technology*. Clermont-Ferrand, France, pp. 771-773.
- Berger, R.G., Macku, C., German, J.B. and Shibamoto, T. (1990). Isolation and identification of dry salami volatiles. *Journal of Food Science* **55**, 1239-1242.
- Beriain, M.J., Peña, M.P. and Bello, J. (1993). A study of the chemical components which characterize Spanish saucisson. *Food Chemistry* **48**, 31-37.
- Beriain, M.J., Sánchez-Monje, J.M. y Bello, J. (1989). Estudio de las modificaciones en las propiedades emulsionantes de las proteínas durante el proceso de curación de algunos derivados cárnicos. *Alimentaria* **208**, 23-29.
- Beriain, M.J., Santamaría, I. y Bello, J. (1990). Relación estadística entre el proceso de curación del chorizo y algunas de las propiedades funcionales de las proteínas. *Alimentaria* **209**, 63-68.
- Berry, E.D., Liewen, M.B., Mandigo, R.W. and Hutkins, R.W. (1990). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Pediococcus* during the manufacture of fermented semidry sausage. *Journal of Food Protection* **53**, 194-197.
- Bhunia, A.K., Kim, W.J., Johnson, M.C. and Ray, B. (1988). Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of Applied Bacteriology* **65**, 261-268.
- BOE (1977). Norma Microbiológica aplicable a chorizo, salchichón y lomo embuchado. *Boletín Oficial del Estado del 12 de junio de 1977*.
- Brenand, C.P., Ha, J.K. and Lindsay, R.C. (1989). Aroma properties and thresholds of some branched-chain and other minor volatile fatty acids occurring in milk fat and meat lipids. *Journal Sensory Studies* **4**, 105-120.
- Bruno, M.E.C. and Montville, T.J. (1993). Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 3003-3010.
- Bryan, F. L. (1980). Foodborne diseases in the United States associated with meat and poultry. *Journal of Food Protection* **43**, 140-145.
- Bucharles, C. et Girard, J.P. (1983). Acidification d'un produit carne. Le saucisson sec. *Review of DEA in Food Science submitted by C. Bucharles*. University of Clermont II. France.
- Bucharles, C., Girard, J.P., Sirami, J. and Pascal, S. (1984). Characteristics of a dry sausage showing excessive acidity. *Science Aliments* **4**, 137-143.
- Buckenhüskes, H.J. (1993). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiology Reviews* **12**, 253-272.
- Burgos, J. (1981). Factores tecnológicos que controlan la calidad de los embutidos crudos madurados. *Filon* **12**, 16-20.
- Buscaillon, S., Berdagué, J.L. and Monin, G. (1993). Time-related changes in volatile compounds of lean tissue during processing of French dry-cured ham. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **63**, 69-75.
-

- Buscailhon, S., Berdagué, J.L., Bousset, J., Cornet, M., Gandemer, G., Touraille, C. and Monin, G. (1994a). Relations between compositional traits and sensory qualities of French dry-cured ham. *Meat Science* **37**, 229-243.
- Buscailhon, S., Monin, G., Cornet, M. and Bousset, J. (1994b). Time-related changes in nitrogen fractions and free amino acids of lean tissue of french dry-cured ham. *Meat Science* **37**, 449-456.
- Buttiaux, R. (1974). Manual de techniques bacteriologiques. 4^a ed. Ed. *Flamarion Medicine Science*. Paris. France.
- Campanini, M., Mutti, P. and Previdi, M.P. (1987). Caracterizzazione di *Micrococcaceae* da insaccati stagionati. *Industria Conserva* **62**, 3-6.
- Campanini, M., Pedrazzoni, I., Barbuti, S. and Baldini, P. (1993). Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the maturation of naturally and artificially contaminated salami; effect of lactic-acid bacteria starter cultures. *International Journal of Food Microbiology* **20**, 169-175.
- Cantoni, C., Molnar, M.R., Renon, P. and Giolitti, G. (1966). Investigations on the lipids of dry sausages. In: *Proc. 12th Meeting European Meat Workers*, Sandefjord, paper E-4.
- Cantoni, C.M., Molnar, R., Renon, P. and Giolitti, G. (1967). Lipolytic micrococci in pork fat. *Journal of Applied Bacteriology* **30**, 190-195.
- Carrascosa, A.V. and 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.
- Cassens, R.G. (1997). Residual nitrite in cured meat. *Food Technology* **51**, 53-55.
- Cassens, R.G., Greaser, M.L., Ito, T. and Lee, M. (1979). Reactions of nitrite in meat. *Food Technology* **43**, 46-57.
- Castellani, A.G. and Niven, C.F. (1955). Factors affecting the bacteriostatic activity of sodium nitrite. *Applied Microbiology* **3**, 154-159.
- Cerise, L., Bracco, U., Horman, I., Sozzi, T. and Wührmann, J.J. (1973). Veränderungen des lipidanteils während des reifungsprozesses von salami aus reinem schweinefleisch. *Fleischwirtschaft* **53**, 223-225.
- Chapman, G.H. (1945). The significance of sodium chloride studies of staphylococci. *Journal of Bacteriology* **50**, 201-203.
- Chasco, J., Beriain, M.J. and Bello, J. (1993). A study of changes in the fat content of some varieties of dry sausage during the curing process. *Meat Science* **34**, 191-204.
- Chasco, J., Beriain, M.J. y Bello, J. (1992a). La oxidación de los componentes grasos y formación de hexanal en la curación del salchichón. *Grasas y aceites* **43**, 143-148.
- Chasco, J., Beriain, M.J. y Bello, J. (1992b). Determinación de aldehidos volátiles por cromatografía gaseosa con espacio de cabeza en el salami, una contribución al control de calidad de su proceso de curación. *Alimentaria* **229**, 33-37.
- Chirife, J. and Favetto, G.J. (1992). Some physicochemical basis of food preservation by combined methods. *Food Research. International* **25**, 389-395.
- Chizzolini, R., Novelli, E. and Zanardi, E. (1998). Oxidation in traditional Mediterranean meat products. 44th *International Congress of Meat Science and Technology*, Barcelona, Spain, pp. 132-141.
-

- Church, F.C., Porter, D.H., Catignani, G.L. and Swaisgood, H.E. (1985). An o-phaldehyde spectrophotometric assay for proteinases. *Analytical Biochemistry* **146**, 343-348.
- 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.
- Clavero, M.R.S. and Beuchat, L.R. (1996). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in broth and processed salami as influenced by pH, water activity and temperature, and suitability of media for its recovery. *Applied Environmental Microbiology* **62**, 2735-2740.
- Comi, G., Cittero, B., Manzano, M., Cantoni, C. and De Bertoldi, M. (1992). Evaluation and characterization of *Micrococccaceae* strains in Italian dry sausages. *Fleischwirtschaft* **72**, 1679-1683.
- Coppola, R., Marconi, E., Rossi, F. and Dellaglio, F. (1995). Artisanal production of naples-type salami: chemical and microbiological aspects. *Italian Journal of Food Science* **1**, 57-62.
- Córdoba, J.J. (1987). Composición química y actividad del agua de embutidos madurados. *Tesina de Licenciatura*, Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.
- Córdoba, J.J. (1990). Transformaciones de los componentes nitrogenados durante la maduración del jamón de cerdo ibérico. *Tesis doctoral*, Universidad de Extremadura, Cáceres.
- Córdoba, J.J. y Fernández-Salguero, J. (1988). Actividad de agua y calidad composicional del salchichón comercial. *Alimentación, equipos y tecnología* **7(1)**, 63-68.
- Coretti, K. (1965). Vorkommen und bedeutung lipolytischer mikroorganismen in Dauerwürsten. *Fleischwirtschaft* **45**, 21-23.
- Coretti, K. (1971). Embutidos: elaboración y defectos. Ed. Acribia. Zaragoza.
- Coventry, J. and Hickey, M.W. (1991). Growth characteristics of meat starter cultures. *Meat Science* **30**, 41-48.
- Croizet, F., Denoyer, C., Tran, N. et Berdagué, J.L. (1992). Les composés volatils du saucisson sec. Evolution au cours de la maturation. *Viandes et Produits Carnes* **13**, 167-170.
- Daeschel, M.A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservative. *Food Technology* **43**, 164-167.
- Daeschel, M.A., McKeney, M.C. and McDonald, L.C. (1990). Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. *Food Microbiology* **7**, 91-98.
- Dahiya, R.S. and Speck, M.L. (1968). Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effect on *Staphylococcus aureus*. *Journal of Dairy Science* **51**, 1568-1572.
- Dahl, T.A., Midden, W.R. and Hartman, P.E. (1989). Comparison of killing of Gram-negative and Gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. *Journal of Bacteriology* **171**, 2188-2184.
- Dainty, R. and Blom, H. (1995). Flavour chemistry of fermented sausages. In: *Fermented Meats*. Eds. G. Campbell-Platt and P.E. Cook. Glasgow. U.K. pp. 176-193.
- Dainty, R. H., Edwards, R. A. y Hibbard, C. M. (1996). Relationship between microbial numbers and some chemical changes in vacuum packe beef stored at 1° C. *Meeting of Concerted Action CT94-1456*. Eds. M. H. Hinton y C. Rowlings. Bristol. U.K., pp. 47-60.
- Daly, C., La Chance, M., Sandine, W. E. and Elliker, P. R. (1973). Control of *Staphylococcus aureus* in sausage by starter cultures and chemical acidulation. *Journal of Food Science* **38**, 426-430.
-

- Daly, C., Sandine, W.E. and Elliker, P.R. (1971). Interactions of food starter cultures and food-pathogens. *Journal Milk Food Technology* **35**, 349-357.
- Darmadji, P., Izumimoto, M., Miyamomto, T. and Katoaka, K. (1990). Lactic fermentation effects on preservatives qualities of "dengeng giling". *Journal of Food Science* **55**, 1523-1527.
- Davey, G.P. (1984). Plasmid associated with diplococcin production in *Streptococcus cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology* **48**, 895-896.
- Davey, G.P. and Richardson, B.C. (1981). Purification and some properties of diplococcin from *Streptococcus cremoris* 346. *N.Z. Journal of Dairy ScienceTechnology* **16**, 84-89.
- Davidson C. M. (1973). Properties of gram negative aerobes isolated from meats. *Journal of Food Science* **38**, 303-305.
- Davis, L., Goodwin, L., Smith, G. and Hole, M. (1993). Lipid oxidation in salted-dried fish: the effect of temperature and light on the rate of oxidation of a fish oil. *Journal Science Food Agriculture* **62**, 355-359.
- Debevere, J.M., Voets, J.P., De Schryver, F. and Huyghebaert, A. (1976). Lipolytic activity of a *Micrococcus sp.* isolated from a starter culture in pork fat. *Lebensmittel-Wissenschaft Technology* **9**, 160-162.
- Degnan, a.J. and Luchansky, J.B. (1992). Influence of beef tallow and muscle on the antilisterial activity of pediocin AcH and liposome-encapsulated pediocin AcH. *Journal of Food Protection* **7**, 552-554.
- Deibel, R. H. (1956). Bacteriological aspects of pure starter culture in the manufacture of sausage. *American Meat Institute Foundation* **20**, 14-18.
- DeKetelaere, A., Demeyer, D., Vandekerckhove, P. y Vervaeke, I. (1974). Stoichiometry of carbohydrate fermentation during dry sausage ripening. *Journal of Food Science* **39**, 297-300.
- Delves-Broughton, J. (1990). Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technology* **44**, 100-117.
- DeMan, J.C. (1983). MPN tables, corrected. *European Journal of Applied in Microbiology and Biotechnology* **17**, 301-305.
- DeMasi, T.W., Wardlaw, F.B., Dick, R.L. and Acton, J.C. (1990). Nonprotein nitrogen (NPN) and free amino acid contents of dry, fermented and nonfermented sausages. *Meat Science* **27**, 1-12.
- Demeyer, D. (1992). Meat fermentation as an integrated process. In: *New technologies for meat and meat products: Fermentation and starter cultures, muscle enzymology and meat ageing, quality control systems*, Ed. J. Smulders. ECCEAMST, Utrecht and AUDET, Nijmegen, pp. 21-36.
- Demeyer, D. And Samejima, K. (1991). Animal biotechnology and meat processing. In: L. Fiems, eds. D.Demeyer & Cottyn. *Biotechnology and the Quality of Animal Production, Proc. OECD Workshop*, Melle, Belgium, Elsevier, Amsterdam.
- Demeyer, D., Claeys, E., Ötles, S., Caron, L. and Verplaetse, A. (1992). Effect of meat species on proteolysis during dry sausage fermentation. *38th International Congress of Meat Science and Technology*. Clermont-Ferrand, France, pp. 775-778.
- Demeyer, D., Hoozee, J. and Mesdom, H. (1974). Specificity of lipolysis during dry sausage ripening. *Journal of Food Science* **39**, 293-296.
-

- Demeyer, D., Vandekerckhove, P. and Moermans, R. (1979). Compounds determining pH in dry sausages. *Meat Science* **3**, 161-167.
- Diaferia, C., Busolli, C., Zanardi, S. and Palmia, F. (1998). Sorption isotherms and diffusion coefficient of water in salami. *44th International Congress of Meat Science and Technology*. Barcelona, pp. 878-879.
- Díaz, O., Fernández, M., García de Fernando, G.D., de la Hoz, L. and Ordóñez, J.A. (1992). Effect of the addition of the aspartyl proteinase from *Aspergillus oryzae* on dry fermented sausage during ripening. In: *Proc. 38th International Conference of Meat Science and Technology*, pp. 779-782.
- Díaz, O., Fernández, M., García de Fernando, G.D., de la Hoz, L. and Ordóñez, J.A. (1993a). Effect of the addition of pronase E on the proteolysis in dry fermented sausages. *Meat Science* **34**, 205-216.
- Díaz, O., Fernández, M., García de Fernando, G.D., de la Hoz, L. and Ordóñez, J.A. (1993b). Effect of the addition of papain on the dry fermented sausages proteolysis. *Journal of the Food Science and Agriculture* **71**, 13-21.
- Díaz, O., Fernández, M., García de Fernando, G.D., De la Hoz, L. and Ordóñez, J.A. (1997). Proteolysis in dry fermented sausages: The effect of selected exogenous proteases. *Meat Science* **46**, 115-128.
- Dierick, N., Vandekerckhove, P. and Demeyer, D. (1974). Changes in nonprotein nitrogen compounds during dry sausage ripening. *Journal of Food Science* **39**, 301-304.
- Dixon, N.M. and Kell, D.B. (1989). The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of microorganisms. *Journal of Applied Bacteriology* **67**, 109-136.
- Domínguez, M.C. and Zumalacárregui, J.M. (1991). Lipolytic and oxidative changes in "Chorizo" during ripening. *Meat Science* **29**, 99-107.
- Domínguez, M.C., Gutierrez, L.M., López, A., Seco, F. y Zumalacárregui, J.M. (1989). Evolución de los principales grupos de microorganismos durante la maduración del chorizo de León. *Alimentaria* **199**, 11-15.
- Doyle, M.P. (1984). *Campylobacter* in foods. In: *Campylobacter Infections in Man and Animals*. Ed. J.P. Bitzler. CRC Press, Inc. Boca Raton, p. 163.
- Doyle, M.P. and Schoeni, J.L. (1984). Survival of and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Applied and Environmental Microbiology* **48**, 855-860.
- Dransfield, E., Etherington, D.J. and Taylor, M.A. (1992). Modelling postmortem tenderisation. II. Enzyme changes during storage of electrically stimulated and non-stimulated beef. *Meat Science* **31**, 75-84.
- Edwards, R.A., Dainty, R.H. and Ordóñez, J.A. (1991). Volatile compounds of microbial origin in dry, fermented Spanish sausages. *2nd International Symposium on the interface between Analytical Chemistry and Microbiology-Chromatography and Mass Spectrometry in Microbiology*, Lund, Suecia.
- Egan, A. F. and Shay, B. J. (1982). Significance of lactobacilli and film permeability in the spoilage of vacuum-packaged beef. *Journal of Food Science* **47**, 1119-1126.
- Egan, A. F., Ford, A. L. and Shay, B. J. (1980). A comparison of *Microbacterium thermosphaerum* and lactobacilli as spoilage organisms of vacuum-packaged sliced luncheon meats. *Journal of Food Science* **45**, 1745-1748.
-

- El Soda, M., Fathallah, S., Ezzat, N., Desmazeaud, M.J. and Abou Donia, S. (1986). The esterolytic and lipolytic activities of lactobacilli. *Sciences des Aliments* **6**, 545-557.
- Everson, C., Danner, W. E. and Hammes, P. A. (1974). Process of curing dry and semidry sausages. U. S. Patent 3814817.
- Fadda, S., Vignolo, G., Holgado, A.P.R. and Oliver, G. (1998). Proteolytic activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages on muscle sarcoplasmic proteins. *Meat Science* **49**, 11-18.
- Faith, N.G., Parniere, N., Larson, T., Lorang, T.D. and Luchansky, J.B. (1997). Viability of *Escherichia coli* O157:H7 in pepperoni during the manufacture of sticks and the subsequent storage of slices at 21, 4 and -20° C under air, vacuum and CO₂. *International Journal of Food Microbiology* **37**, 47-54.
- Farber, J.M., Sanders, G.W. and Johnston, M.A. (1989). A survey of various foods for the presence of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* **52**, 456-459.
- Fereidoon, S.L., Rubin, J. and Wood, D.F. (1988). Stabilization of meat lipids with nitrite curing mixtures. *Meat Science* **25**, 73-80.
- Fernández, M., Díaz, O., García de Fernando, G.D., Hierro, E., Ordóñez, J.A. y de la Hoz, L. (1995). Modificaciones de los lípidos durante la maduración de los embutidos. *Alimentación, Equipos y Tecnología* **14** (1), 59-65.
- Fernández-Salguero, J. (1995). Conservación de productos cárnicos por aplicación de factores combinados: Productos españoles de humedad intermedia y alta. *Revista española de Ciencia y Tecnología de Alimentos* **35**, 233-246.
- Fernández-Salguero, J. y Llinares, M. (1985). Water activity (a_w) in cooked Spanish meat products as a function of moisture and salt contents. *Fleischwirtschaft* **65**, 4-7.
- Fernández-Salguero, J., Gómez, R. and Carmona, M.A. (1994). Water activity of Spanish intermediate moisture meat products. *Meat Science* **38**, 341-346.
- Flores, J. (1994). Problemática de la normativa de embutidos crudos curados. *Eurocarne* **23**, 49-58.
- Flores, J. and Toldrá, F. (1993). Curing. In: *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*. Macrae, R, Robinson, R.K. and Sandler, M.J. (Eds). Academic Press, London, pp. 1277-1282.
- Flores, J., Marcus, J.R., Nieto, P., Navarro, J.L. and Lorenzo, P. (1997). Effect of processing conditions on proteolysis and taste of dry-cured sausages. *Z Lebensm Unters Forsch A* **204**, 168-172.
- Flores, J., Nieto, P., Bermell, S. y Miralle, M.C. (1985). Cambios en los lípidos del jamón durante el proceso de curado, lento y rápido, y su relación con la calidad. *Revista Agroquímica de Tecnología Alimentaria* **25**, 117-124.
- Foegeding, P.M., Thomas, A.B., Pilkington, D.H. and Klaenhammer, T.R. (1992). Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in-situ produced pediocin during dry fermented sausage production. *Applied Environmental Microbiology* **58**, 884-890.
- Folch, J., Lees, M. and Stanley, G.H.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids of animal tissues. *Journal of Biology and Chemistry* **226**, 497-509.
- Fox, J.B. (1994). Los pigmentos de la carne. En: *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos*. J.F. Price y B.S. Schweigert. Ed. Acribia. Zaragoza, pp. 175-198.
-

- Frey, W. (1995). Fabricación fiable de embutidos. Ed. Acribia, S.A.
- García de Fernando, G. D. and Fox, P.F. (1991). Study of proteolysis during the processing of a dry fermented pork sausage. *Meat Science* **30**, 367-383.
- 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.
- García-Regueiro, J.A., Rius, M.A., Hortós, M., Hugas, M. and Díaz, I. (1998). Influence of starter cultures on the volatile profile of a Spanish fermented sausage (fuet). *44th International Congress of Meat Science and Technology*. Barcelona, Spain, pp. 802-803.
- Gardener, H.W. (1980). Lipids enzymes: lipases, lipooxygenases and hydroperoxidases. In: *Autooxidation in foods and biological systems*. Ed. Plenum Press, Nueva York, pp. 447-504.
- Garriga, M., Compte, M., Casademont, G. y Moreno-Amich, R. (1988). Influencia de los carbohidratos en el proceso de fermentación del salchichón. *Revista Agroquímica de Tecnología Alimentaria* **28 (4)**, 548-557.
- Garriga, M., Hugas, M., Gispert, M.J. and Sarraga, C. (1993). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Enterococcus faecium* CTC 492 isolated from fermented sausages. *FEMS Microbiology Reviews* **12**, 131-135.
- Garriga, M., Hugas, M., Gou, P., Aymerich, M.T., Arnau, J. and 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.
- Gasser, F. (1994). Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bulletin Institut Pasteur* **92**, 45-67.
- Gatellier, P., Anton, M., Chraïti, F. and Renner, M. (1992). Relationships between lipid oxidation, antioxidation enzyme activities and colour stability in raw beef during storage. *38th International Congress Meat Science Technology, Clermont-Ferrand, Francia*, pp. 495-498.
- Gaya, D., Medina, M., Bautista, L. and Núñez, M. (1988). Influence of lactic starter inoculation, cured heating and ripening temperature on *Staphylococcus aureus* behavior in Manchego cheese. *International Journal of Food Microbiology* **6**, 249-257.
- Gehlen, K.H. (1989). Einfluss der technologie auf die rohwarereinigung mit *Lactobacillus curvatus*, *Micrococcus varians* und weiteren starterorganismen unter besonderer berücksichtigung der nitratereduktion. Thesis, Universität Hohenheim.
- Genigeorgis, C. (1976). Problems associated with perishable processed meats. *Food Technology* **40**, 140-154.
- Genigeorgis, C. (1978). Fermented sausages. Recent experiences. In: *Proceedings Meat Conference*, University of California, Davis, p. 21.
- Genigeorgis, C. (1986). Problems associated with preishable processed meats. *Food Technology* **4**, 140-154.
- Genigeorgis, C.A. (1989). Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. *International Journal of Food Microbiology* **9**, 327-360.
- Gill, C.O. and Newton, K.G. (1977). The development of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperatures. *Journal Applied Bacteriology* **43**, 189-195.
- Gilliland, S. E. and Speck, M. L. (1975). Inhibition of psychrotrophic bacteria by lactobacilli and pediococci in nonfermented refrigerated foods. *Journal of Food Science* **40**, 903-905.
-

- Gilliland, S.E. and Speck, M.L. (1977). Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and food-borne pathogens in associative culture. *Journal of Food Protection* **40**, 820-823.
- Giraffa, G. (1995). Enterococcal bacteriocins: their potential as anti-*Listeria* factors in dairy technology. *Food Microbiology* **12**, 291-299.
- Girard, J.P., Buchard, C., Berdague, J.L. und Ramihone, M. (1989). Einfluss ungesättigter fette auf abtrocknungs und fermentationsvorgänge von rohwürsten. *Fleischwirtschaft* **69**, 255-260.
- Glass, K.A. and Doyle, M.P. (1989). Fate of *Listeria monocytogenes* in processed meat products during refrigerated storage. *Applied Environmental Microbiology* **55**, 1565-1570.
- Glass, K.A., Loeffelholz, J.M., Ford, J.P. and Doyle, M.P. (1992). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 2513-2516.
- Goll *et al.* (1970). Citado por Lawrie (1998).
- Gómez, R., Cabezas, L., Fernández-Salguero, J., Marcos, A., Alcalá, M. y Esteban, M.A. (1987). Determinación de la actividad del agua en diferentes conservas de pescado. *IX Congreso Internacional de la Conserva (Calidad y seguridad)*. Murcia.
- González, C.F. and Kunka, B.S. (1987). Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 2534-2538.
- González-Fandos, E., Otero, A., Sierra, M., García-López, M.L. and Prieto, M. (1994). Effect of three commercial starters on growth of *Staphylococcus aureus* and enterotoxins (A-D) and thermonuclease production in broth. *International Journal of Food Microbiology* **24**, 321-327.
- González-Fandos, E., Sierra, M., Otero, A. and García-López, M.L. (1997). Behaviour and control of *Staphylococcus aureus* during manufacture and ripening of dry fermented sausages. In: *Factors affecting the microbial quality of meat*. Ed. M.H. Hinton and C. Rowlings. University of Bristol Press, Bristol, UK, pp. 169-175.
- González-Fernández, C., Jaime, I. and Rovira, J. (1998). Effect of sugar concentration on "chorizo" dry sausage using different lactic acid bacteria as starter cultures. *44th International Congress of Meat Science and Technology*. Barcelona, Spain, pp. 836-837.
- 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.
- Gorospe, O., Astiasarán, I., Sánchez-Monge, J.M. y Bello, J. (1989). Estudio del desarrollo del color en derivados cárnicos crudos-curados, valorado por medidas químicas y físicas. *Alimentaria* **206**, 37-41.
- Gray, J.I. and Pearson, A.M. (1987). *Advances in Meat Research*. Vo. 3. AVI Boor, Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 221-269.
- Greer, G.G. and Murray, A.C. (1988). Effect of pork muscle quality on bacterial growth and retail case life. *Meat Science* **24**, 61-72.
- Hadden, J.P., Ockerman, H.W., Cahill, V.R., Parrett, N.A. and Borton, R.J. (1975). Influence of sodium nitrite on the chemical and organoleptic properties of comminuted pork. *Journal of Food Science* **40**, 626-630.
-

- Haefeli, R.J. and Glaser, D. (1990). Taste responses and thresholds obtained with the primary amino acids in humans. *Lebensmittel-Wissenschaft Technology* **23**, 523-527.
- Hagen, B.F., Berdague, J.L., Holck, A.L., Naes, H. and Blom, H. (1996). Bacterial proteinase reduces maturation time of dry fermented sausages. *Journal of Food Science* **61**, 1024-1029.
- Hammes, W.P. (1991). The application of lactic acid bacteria in meat fermentation. In: *Actes du Colloque LACTIC 91*. Caen, France, pp. 199-204.
- Hammes, W.P. and Hertel, C. (1996). Selection and improvement of lactic acid bacteria used in meat and sausage fermentation. *Lait* **76**, 159-168.
- Hammes, W.P. and Knauf, H.J. (1992). Starters in the processing of meat products. *38th International Congress of Meat Science and Technology*, Clermont-Ferrand, France, 101-110.
- Hammes, W.P. y Hertel, C. (1998). New developments in meat starter cultures. *Meat Science* **49**, 125-138.
- Hammes, W.P., Bantleon, A. and Muis, S. (1990). Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiology Review* **87**, 615-625.
- Hansen-Moller, J., Hinrichsen, L. and Jacobsen, T. (1997). Evaluation of peptides generated in Italian-style dry-cured ham during processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 3123-3128.
- Hartmann, S., Wolf, G. and Hammes, W.P. (1995). Reduction of nitrite by *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus piscifermentans*. *Systematic and Applied Microbiology* **18**, 323-328.
- Havenaar, R. and Huis in't Veld, J.H.J. (1992). The lactic acid bacteria in health & disease. In: *The lactic acid bacteria, vol. 1*. Ed. Wood B.J.B. Elsevier, London New York, pp. 151-170.
- Héchar, Y., Derijard, B., Letellier, F. and Cenatiempo, Y. (1992). Characterization and purification of mesenterocin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of General Microbiology* **138**, 2725-2731.
- Hechelmann, H., Lücke, F.K. und Schillinger, U. (1988). Ursachen und vermeidung von *Staphylococcus aureus*. Intoxikationen nach verzehr von rohwurst und rohschinken. *Mittbl. Bundesanstalt Fleischforsh. Kulmbach, Heft* **100**, 7956-7964.
- Henderson, J.T., Chopko, A.L. and Van Wassenaar, P.D. (1992). Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **295**, 5-12.
- Hierro, E., de la Hoz, L. and Ordoñez, J.A. (1997). Contribution of microbial and meat endogenous enzymes to the lipolysis of dry fermented sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 2989-2995.
- Hinkens, J.C., Faith, N.G., Lorang, T.D., Bailey, P., Buege, D., Kaspar, C.W., and Luchansky, J.B. (1996). Validation of pepperoni processes for control of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection* **59**, 1260-1266.
- Hinrichsen, L. and Pedersen, S.B. (1995). Relationship among flavour volatile compounds, chemical changes and microflora in Italian-type dry-cured ham during processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, 2932-2940.
- Holck, A., Axelsson, L., Birkland, S.E., Aukrust, T. and Blom, H. (1992). Purification and amino acid sequence of sakacina A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *Journal of General Microbiology* **138**, 2715-2720.
-

- Holzappel, W. H., Geisen, R. and Schillinger, U. (1995). Biological preservation of food with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Science* **24**, 343-362.
- Horn, N., Swindell, S., Dodd, H. and Gasson, M. (1991). Nisin biosynthesis genes are encoded by a novel conjugative transposon. *Molecular General Genetic* **228**, 129-135.
- Hotchkiss, J.H. and Cassens, R.G. (1987). Nitrate, nitrite and nitroso compounds in foods. *Food Technology* **41**, 127-135.
- Huang, C.C. and Lin, C.W. (1995). Change in quality of chinese-style sausage inoculated with lactic acid bacteria during storage at 3° C and 25° C. *Journal of Food Protection* **58**, 1227-1233.
- Hugas, M. (1993). Acción antimicrobiana de las bacterias lácticas: sistemas naturales de conservación de los alimentos. *Eurocarne* **15**, 47-52.
- Hugas, M. and Monfort, J. M. (1997). Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chemistry* **59**, 547-554.
- Hugas, M., Aymerich, T., Garriga, M., Ylla, J., Vallier, J. and Monfort, J.M. (1998). Applications of enterocin A as a biopreservative against *Listeria monocytogenes* in meat products. *Proceedings 44th International Congress of Meat Science and Technology*. Barcelona, Spain. pp. 334-335
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T. y Monfort, J.M. (1993). Caracterización bioquímica de lactobacilos aislados de salchichones. *International Journal of Food Microbiology* **18**, 107-113.
- Hugas, M.; Garriga, M.; Aymerich, T. and Monfort, J.M. (1995). Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. *Journal Applied Bacteriology* **79**, 322-330.
- Huis in't Veld, J. H. (1996). Biopreservation of Foods. *Meeting of Concerted Action CT94-1456*. Eds. M. H. Hinton and C. Rowlings. Bristol, U.K. pp. 133-140.
- Hurst, A. (1981). Nisin. *Advances in Applied Microbiology*. **27**, 85-123.
- Ibáñez, C., Quintanilla, L., Cid, C., Astiasarán, I. and Bello, J. (1996). Dry fermented sausages elaborated with *Lactobacillus plantarum*-*Staphylococcus carnosus*. Part I: Effect of partial replacement of NaCl with KCl on the stability and the nitrosation process. *Meat Science* **44**, 227-234.
- Ibáñez, C., Quintanilla, L., Cid, C., Astiasarán, I. and Bello, J. (1997). Dry fermented sausages elaborated with *Lactobacillus plantarum*-*Staphylococcus carnosus*. Part II: Effect of partial replacement of NaCl with KCl on the proteolytic and insolubilization processes. *Meat Science* **46**, 277-284.
- ICMSF. (1983). International Commission on Microbiological Specifications for Foods. *Ecología microbiana de los alimentos vol. 2. Productos alimenticios*. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza. España.
- IDF. International Dairy Federation. (1980). Factors affecting the results of an activity test of mesophilic cheese starters. *International Dairy Federation Bulletin, Document 129*.
- Igarashi, T., Kono, Y. and Tanaka, K. (1996). Molecular-cloning of manganese catalase from *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 29521-29524.
- Igene, J.O. and Pearson, A.M. (1979). Role of phospholipids and tryglicerides in warmed-over flavor development in meat model systems. *Journal of Food Science* **44**, 1285-1290.
-

- Igene, J.O., Yamauchi, K., Pearson, A.M., Gray, J.I. and Aust, S.D. (1985). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **33**, 364-368.
- ISO R-936. (1973). International Standards Meat and Meat Products. Determination of ash. *International Organization for Standardization*, Ginebra.
- ISO-R2917. (1974). International Standards Meat and Meat Products. Measurement of the pH (Reference Method). *International Organization for Standardization*, Ginebra.
- Jankiewicz, L., Kwasny, M., Wasyluk, K. and Graczyk, A. (1994). Structure studies on the nitrosyl deriviate of heme. *Journal of Food Science* **59(1)**, 57-60.
- Jarvis, B. and Mahoney, R.R. (1969). Inactivation of nisin by α -chymotrypsin. *Journal of Dairy Science* **52**, 1448-1450.
- Jensen, L. B. and Padock, L. S. (1940). US Patent 2, 225, 783.
- Jessen, B. (1995). Starter cultures for meat fermentation. In: *Fermented Meats*. Eds. G. Campbell-Platt and P.E. Cook. Glasgow. U.K. pp. 130-154.
- Jiménez-Díaz, R., Piard, J.C., Ruiz-Barba, J.L. and Desmazeaud, M.J. (1990). Isolation of a bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain from a green olive fermentation. Third Symposium on Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiology Review* **87**, 91-95.
- Joerger, M.C. and Klaenhammer, T.R. (1986). Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *Journal of Bacteriology* **167**, 439-446.
- Joerger, M.C. and Klaenhammer, T.R. (1990). Cloning, expression and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J. *Journal of Bacteriology* **172**, 6339-6347.
- Johansson, G., Berdagué, J.L., Larsson, M., Tran, N. and Borch, E. (1994). Lipolysis, proteolysis and formation of volatile components during ripening of a fermented sausage with *Pedococcus pentosaceus* and *Staphylococcus xylosus* as starter cultures. *Meat Science* **38**, 203-218.
- Johnson-Nessler, M.J. (1941). Isolation and properties of a pure yeast polypeptidase. *Proc. 3th International Congress of Microbiology*. New York. USA, p. 348.
- Kanatani, K., Tahara, T., Yoshida, K., Miura, H., Sakamoto, M. and Oshimura, M. (1992). Plasmid-associated bacteriocin production by immunity of *Lactobacillus acidophilus* TK8912. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* **56**, 648-651.
- Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **49**, 209-224.
- Keller, J.E., Skelley, G.C. and Acton, J.C. (1974). Effect of meat particle size and casing diameter on summer sausage properties during drying. *Journal Milk Food Technology* **37**, 101-104.
- Kemp, J.D., McCampbell, H.C. and Grainger, R.B. (1957). Procedure for sampling and laboratory rendering of ham fat and characteristics of hams and fat during aging. *Food Technology* **11**, 321-323.
- Kenneally, P.M., Leuschner, R.G. and Arendt, E.K. (1998a). Evaluation of the lipolytic activity of starter cultures for meat fermentation purposes. *Journal of Applied Microbiology* **84**, 839-846.
-

- Kenneally, P.M., Schwarz, G., Fransen, N.G. and Arendt, E.K. (1998b). Lipolytic starter culture effects on production of free fatty acids in fermented sausages. *Journal of Food Science* **63**, 538-543.
- Khao, Y.J., Starnes, W.L. and Behal, F.J. (1978). Human kidney alanine aminopeptidase: physical and kinetic properties of a sialic acid containing glycoprotein. *Biochemistry* **17**, 2990-2994.
- Killday, K.B., Tempesta, M.S., Bayle, M.E. and Metral, C.J. (1988). Structural characterization of nitrosylhemochromogen of cooked cured meat: Implications in the meat-curing reaction. *Journal Agriculture Food Chemist* **36**, 909-913.
- Klaenhammer, T.R. (1993). Genetics bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology* **12**, 39-86.
- Klement, J.T. and Cassens, R.G. (1974). The effect of bacterial fermentation on protein solubility in a sausage model system. *Journal of Food Science* **39**, 833-835.
- Klement, J.T., Cassens, R.G. and Fennema, O.R. (1973). The association of protein solubility with physical properties in a fermented sausage. *Journal of Food Science* **38**, 1128-1131.
- Klement, J.T., Cassens, R.G. and Fennema, O.R. (1974). The effect of bacterial fermentation on protein solubility in a sausage model system. *Journal of Food Science* **39**, 833-835.
- Klettner, P.G. and Baumgartner, P.A. (1980). The technology of raw sausage manufacture. *Food Technology Australia* **32**, 380-384.
- Koohmaraie, M., Seideman, S.C., Schollmeyer, S.C., Duston, T.R. and Crouse, J.D. (1987). Effect of postmortem storage on Ca⁺⁺ dependent proteases, their inhibitor and myofibril fragmentation. *Meat Science* **19**, 187-196.
- Kornacki, J.L. and Marth, E.H. (1982). Foodborne illness caused by *Escherichia coli*: A review. *Journal of Food Protection* **45**, 1057-1060.
- Kostenko, Y.G., Solodovnikova, G.I., Kuznetsova, G.A., Spitsyna, D.N. and Kuznetsova, T.G. (1998). Production of dry-cured meat products using the starter cultures of new generation. 44th *International Congress of Meat Science and Technology*. Barcelona, pp. 834-835.
- Kotter, L. und Prändl, O. (1958). Physikalisch-chemische vorgänge bei der fabrikation schnittfester rohwürste. I. Mitteilung. *Fleischwirstchaft* **10**, 26-29.
- Kotzekidou, P. and Bloukas, J.G. (1996). Effect of protective cultures and packaging film permeability on shelf-life of sliced vacuum-packed cooked ham. *Meat Science* **42**, 333-345.
- Kozak, W., Bardowski, J. and Dobrzanski, W.T. (1978). Lactostrepcins-acid bacteriocins produced by lactic spptreptococci. *Journal of Dairy Research* **45**, 247-257.
- Kröckel, L. (1995). Bacterial fermentation of meats. In: *Fermented Meats*. Eds. G. Campbell-Platt and P.E. Cook. Glasgow. U.K. pp. 69-130.
- Kuo, J.C., Yuan, C.K.K., Lee, F.L. and Shin, C.H. (1986). Vacuum packaged chinese sausage as influenced by different fat and nitrite levels. *Food Science (Taiwan)* **131**, 21-31.
- Labuza, T.P., Acott, K., Tatini, S.R., Lee, R.Y., Flimk, J., McCall, W. (1976). Water activity determination: "A collaborative study of different methods". *Journal of Food Science* **41**, 910-917.
- Landvogt, A. and Fischer, A. (1990). Dry sausage ripening. Targeted control of the acidification capacity of the starter cultures. *Fleischwirstchaft* **70**, 1134-1140.
-

- Law, B.A. and Kolstad, J. (1983). Proteolytic systems in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **49**, 225-245.
- Lawrie, R.A. (1998). En: *Ciencia de la carne*. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza.
- Leistner, L. (1978). Hurdle effect and energy saving. In: *Food Quality and Nutrition*. Ed., W.K. Downey. Applied Science, pp. 553-557.
- Leistner, L. (1986a). Allgemeines über Rohschinken. *Fleischwirtschaft*, **66**. 496-510.
- Leistner, L. (1986b). Allgemeines über Rohwurst. *Fleischwirtschaft*, **66**. 299-300.
- Leistner, L. (1987). Shelf-stable products and intermediate moisture foods based on meat. In: *Water activity: Theory and application to food*. Eds. L.B. Rockland & L.R. Beuchat. New York & Basel: Marcel Dekker, Inc, p. 304.
- Leistner, L. (1994). *Food Design by hurdle technology and HACCP*. Ed. Adalbert-Raps-Foundation, Kulmbach, Germany, pp. 2-62.
- Leistner, L. (1995). Stable and safe fermented sausages world-wide. In: *Fermented Meats*. Eds. G.Cambell-Platt and P.E. Cook. Blackie Academic and Professional, Londres, pp 160-175.
- Leistner, L. (1996). Food protection by hurdle technology. *Meeting of Concerted Action CT94-1456*. Eds. M. H. Hinton and C. Rowlings. Bristol. U.K, pp. 61-73.
- Leistner, L. and Echardt, C. (1979). Vorkommen toxinogener Penicillien bei Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtschaft* **59**, 1892-1896.
- Leistner, L. and Wirth, F. (1972). Importance and determination of water activity (a_w value) of meat and meat products. *Fleischwirtschaft* **52**, 1335-1337.
- León, F. y Millán, R. (1977). Cambios químicos durante la maduración del salchichón. 1: Alteraciones en la fracción lipídica. *Archivos de zootecnia* **26**, 293-301.
- León, F., Millan, R. y Serrano-Moreno, A. (1978). Cambios químicos durante la maduración del salchichón. 3. Modificaciones experimentadas por los compuestos nitrogenados solubles en agua. *Archivos de zootecnia* **27**, p. 105.
- Leyer, G.J., Wang, L.L. and Johnson, E.A. (1995). Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 3752-3755.
- Liepe, H., Pfeil, E. and Porobic, R. (1990). Influence of sugars and bacteria on dry sausage souring. *Fleischwirtschaft* **70**, 189-192.
- Liepe, H.U. (1982) Starter cultures in meat production. In: *Biotechnology vol. 5*. Ed. H.J. Rehm & G. Reed. Basel Chemie, pp. 400-424.
- Liepe, H.U. (1983). Starter cultures in meat production. *Biotechnology* **5**, 399-424.
- List, D. And Klettner, P.G. (1978). Citado por Roca and Incze, 1990.
- Liu, W. and Hansen, N.J. (1990). Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 2551-2558.
- Lizarraga, T., Melgar, J. y Bello, J. (1989). Estudio de los cambios químicos en los componentes grasos del chorizo con el proceso de curación. *Grasas y Aceites* **40**, 370-375.
- Lois, A.L., Gutiérrez, L.M., Zumalacárregui, J.M. and López, A.(1987). Changes in several constituents during the ripening of "chorizo"- a Spanish dry sausage. *Meat Science* **19**, 169-177.

- López, M.O., Hoz, L., Cambero, M.I., Gallardo, E., Reglero, G. and Ordóñez, J.A. (1992). Volatile compounds of dry hams from iberian pigs. *Meat Science* **31**, 267-277.
- Lücke, F. K. (1985). Fermented sausages. In: *Microbiology of fermented foods*, vol 2. Ed. B.J.B. Wood. Elsevier Applied Science, Londres. pp. 41-83
- Lücke, F.K. (1987). Procesos microbiológicos en la elaboración de embutidos secos y jamones crudos. *Fleischwirtschaft (español)* **2**, 39-46.
- Lücke, F.K. (1994). Fermented meat products. *Food Research International* **27**, 299-307.
- Lücke, F.K. and Hechelmann, H. (1987). Starter cultures for dry sausages and raw ham. Composition and effect. *Fleischwirtschaft* **67**, 307-314.
- Lücke, F.K. und Hechelmann, H. (1986). Starterkulturen für Rohwurst und Rohschinken. *Fleischwirtschaft* **66**, 154-166.
- Lücke, F.K., Brümmer, J.M., Buckenhüskes, H., Garrido Fernández, A., Rodrigo, M. and Smith, J.E. (1990). Starter cultures development. In: *Processing and Quality of Foods, vol. 2, Food Biotechnology: Avenues to Healthy and Nutrition products*. Eds. P. Zeuthen, J.C. Cheftel, C. Eriksson, T.R. Gormley, P. Linko, K. Paulus. Elsevier Applied Science, London and New York, pp. 2.11-2.36,
- Macdonald, B., Gray, J.E. and Gibbins, L.D.N. (1980). Role of nitrite in cured meat flavour: antioxidant role of nitrite. *Journal of Food Science* **45**, 893-897.
- Machinski, M. (1996). Nitratos y nitritos en embutidos comercializados. *Alimentaria* **271**, 45-46.
- MacLeod, G. (1986). The scientific and technological basis of meat flavour. In: *Developments in Food Flavours*. Birch, G.G. and Lindley, M.G. (Ed), London, Elsevier, pp. 191-223.
- Maggi, E., Bracchi, P.G. and Chizzolini, R. (1977). Molecular weight distribution of soluble polypeptides from the Parma country ham, before, during and after maturation. *Meat Science* **1**, 129-134.
- Mäkelä, P. M., Korkeala, H. J. and Laine, J.J. (1990). Raw materials of cooked ring sausages as a source of spolaige lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection* **53(11)**, 965-968.
- Marangkey, A.E., Kataoka, E., Miyameto, T. and Nakae, T. (1989). Influence of starter culture on bacterial flora in meat patty prepared from ground beef. *Japanese Journal of Zootechnology Science* **60**, 292-299.
- Marchesini, B., Bruttin, A., Romailier, N., Moreton, R.S., Stucchi, C. And Sozzi, T. (1992). Microbiological events during commercial meat fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 1067-1069.
- Marcos, D. (1991). Embutidos crudos curados españoles. Ed. Ayala. Madrid.
- Marcuse, R. and Johansson, L. (1973). *Journal American Oil Chemistry Society* **50**, 387-390.
- Martínez, E.J., Rodríguez, J., Soto, T. y Martínez, A. (1982). Estudio comparativo de la flora microbiana presente en embutidos fermentados. *Anales de Bromatología* **34**, 259-268.
- Mateo, J. and Zumalacárregui, J.M. (1996a). Volatile compounds in chorizo and their changes during ripening. *Meat Science* **44**, 255-273.
- Mateo, J. y Zumalacárregui, J.M. (1996b). El flavor de los embutidos crudos-curados. *Alimentación, Equipos y Tecnología* **15 (7)**, 59-70.
-

- McKay, A.M. (1990). Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* against *Listeria* spp. *Letters Applied Microbiology* **11**, 15-17.
- Mckenzie, W., Taylor, W. y Gilbert, E. (1948). Recent experiences in the identification of *Bacterium coli type I*. *Journal of Genetic Microbiology* **2**, 197-201.
- McMullen, L. M. and Stiles, M. E. (1996). Potential for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. *Journal of Food Protection* **suppl.**, 64-71.
- Melgar, M.J., Sánchez-Monje, J.M. y Bello, J. (1990). Estudio de los cambios experimentados en las propiedades químicas de la grasa durante el proceso de curación del chorizo de Pamplona. *Alimentaria* **210**, 21-26.
- Melton, S.L. (1983). Methodology for following lipid oxidation in muscle foods. *Food Technology* **37**, 105-111.
- Mersmann, H.J., Brown, L.J., Underwood, M.C. and Stanton, H.C. (1974). Catecholamine-induced lipolysis in swine. *Comp. Biochemistry and Physical Chemistry* **47**, 263-270.
- Metaxopoulos, J., Genigeorgis, C., Fanelli, M.J., Franti, G. and Cosma, E. (1981). Production of Italian dry salami. Initiation of staphylococcal growth in salami under commercial manufacturing conditions. *Journal of Food Protection* **44**, 347- 352.
- Meynier, A., Gandemer, G., Novelli, E., Chizzolini, R. and Zanardi, E. (1998). Aroma volatile molecules of salame Milano. *Meat Science*, pendiente de publicación, citado por Chizzolini *et al.* (1998).
- Miralles, M.C., Flores, J. and Perez-Martinez, G. (1996). Biochemical tests for the selection of *Staphylococcus* strains as potential meat starter cultures. *Food Microbiology* **13**, 227-236.
- Möhler, K. and Sheerer, C. (1979). Bilanz der bildung von päkelfarbstoff im muskelfleish. Reaktionen von nitrit mit schweinemuskel. *Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und Forschung* **147**, 123-129.
- Molly, K., Demeyer, D., Civera, T. and Verplaetse, A. (1996). Lipolysis in a Belgian sausage. Relative importance of endogenous and bacterial enzymes. *Meat Science* **43**, 235-244.
- Molly, K., Demeyer, D., Johansson, G., Raemaekers, M., Ghistelinck, M. and Geenen, I. (1997). The importance of meat enzymes in ripening and flavor generation in dry fermented sausages. First results of a European project. *Food Chemistry* **59**, 539-545.
- Monfort, J. M. (1994). Los bioconservadores como futura alternativa en la industria cárnica. *Expocarne. Feria Internacional de las Industrias Cárnicas*. Valencia. pp. 75-86.
- Monfort, J. M. y Garriga, M. (1993). Ejemplo de utilización de bacterias ácido lácticas en la bioprotección de productos crudos curados. *Eurocarne* **22**, 23-26.
- Monteil P. (1991). Incidence des ferments d'ensemencement sur la formation des composés d'arômes dans le saucisson sec. Thesis, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France.
- Montel, M.C., Reitz, J., Talon, R. and Berdague, J.L. (1997). Biochemical activities of Micrococcaceae and their effects on the aromatic profiles and odors of a dry sausage model. *Food Microbiology* **13**, 489-499.
- Montel, M.C., Reitz, J., Talon, R., Berdagué, J.L. and Rousset-Akrim, S. (1996). Biochemical activities of Micrococcaceae and their effects on the aromatic profiles and odours of a dry sausage model. *Food Microbiology* **13**, 489-499.
-

- Montel, M.C., Seronine, M.P., Talon, R. and Hebraud, M. (1995). Purification and characterization of a dipeptidase from *Lactobacillus sake*. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 837-839.
- Montel, M.C., Talon, R., Berdague, J.L. and Cantonnet, M. (1993). Effects of starter cultures on the biochemical characteristics of french dry sausage. *Meat Science* **35**, 229-240.
- Montel, M.C., Talon, T., Cantonnet, M. et Berdague, J.L. (1992). Activités métaboliques des bactéries lactiques des produits carnes. En: *Les bactéries lactiques*. Eds. G. Novel et J.F. LeQuerler, Ardie Normandia, Caen, pp. 67-76.
- Montville, T.J. and Bruno, M.E.C. (1995). Evidence that dissipation of proton motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobial proteins. *International Journal of Food Microbiology* **24**, 53-74.
- Moore, J.E. and Madden, R.H. (1997). Preservation of vacuum-packaged pork liver pate by fermentation. *Journal of Food Protection* **60**, 791-794.
- Morita, H., Niu, J., Sakata, R. and Nagata, Y. (1996). Red pigment of Parma ham and bacterial influence on its formation. *Journal of Food Science* **61**, 1021-1023.
- Mortvedt, C.I., Nissen-Meyer, J., Sletten, K. and Nes, I.F. (1991). Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 1829-1834.
- Mossel, D.A.A., Bijker, P.G.H. und Eldering, I. (1978). Streptokokken der Lancefield-Gruppe D in lebensmitteln und trinkwasser-Ihre bedeutung, erfassung und bekämpfung. *Archiv fur bebensmittel Hygiene* **29**, 121-127.
- Muletpowell, N., Lacostearmynot, A.M., Vinas, M. and Debuochberg, M. S. (1998). Interactions between pairs of bacteriocins from lactic bacteria. *Journal of Food Protection* **61**, 1210-1212.
- Munuera, I., Vázquez, I. e Ibáñez, J. (1991). Investigación de *Salmonella* en alimentos: Comparación de varios métodos de enriquecimiento selectivo. *Alimentaria* **225**, 35-40.
- Muriana, P. M. (1996). Bacteriocins for control of *Listeria spp.* in food. *Journal of Food Protection suppl.*, 54-63.
- Muriana, P.M. and Klaenhammer, T.R. (1987). Conjugal transfer of plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity in *Lactobacillus acidophilus* 88. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 553-560.
- Muriana, P.M. and Klaenhammer, T.R. (1991). Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 114-121.
- Naes, H. and Nissen-Meyer, J. (1992). Purification and N-terminal amino acid sequence determination of the cell-wall-bound proteinase from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. *Journal of General Microbiology* **138**, 313-318.
- Naes, H., Chrzanowska, J., Nissen-Meyer, J., Pedersen, B.O. and Blom, H. (1991). Fermentation of dry sausage. The importance of proteolytic and lipolytic activities of lactic acid bacteria. *Proc. 37th International Congress of Meat Science and Technology* pp. 914-917.
- Naes, H., Holck, A.L., Axelsson, L.T., Andersen, H.J. and Blom, H. (1995). Accelerated ripening of dry fermented sausage by addition of a *Lactobacillus* proteinase. *International Journal of Food Science and Technology* **29**, 651-659.
-

- Nawar, W.W. (1995). Lípidos. En: *Química de los alimentos*. O.W. Fennema. Acribia, Zaragoza, España, p. 157.
- Nicolas, J.A. (1985). Contamination of meat products with *Listeria monocytogenes* in Haute-Vienne, France. *Science des Aliments* **5**, 175-184.
- Nielsen, H.J.S. and Kemner, M.K.B. (1989). Lipolytic activity of meat starter cultures. *Proc. 35th International Congress Meat Science and Technology*, Copenhagen, Denmark, pp. 318-322.
- Nielsen, J.W., Dickson, J.S. and Crouse, J.D. (1990). Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. *Applied Environmental Microbiology* **56**, 2142-2145.
- Nieto, P., Molina, I., Flores, J., Silla, M.H. and Bermell, S. (1989). Lipolytic activity of microorganism isolated from dry-cured ham. *Proc. 35th International Congress Meat Science and Technology*. Copenhagen, Dinamarca, pp. 323-329.
- Nieto-Lozano, J.C., Nissen-Meyer, J., Sletten, K., Peláez, C. and Nes, I.F. (1992). Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of General Microbiology* **138**, 1985-1990.
- Niinivaara, F. P. (1955). Über den einfluß von bakterien-reinkulturen auf die reifung und umrötung der rohwürst. *Acta Agralia Fennica* **85**, 1-128.
- Niinivaara, F.P., Pohja, M.S. and Komulainen, S.E. (1964). Some aspects about using bacterial pure cultures in the manufacture of fermented sausages. *Food Technology* **18**, 147-153.
- Niskanen, A. and Nurmi, E. (1976). Effect of starter culture on staphylococcal enterotoxin and thermonuclease production in dry sausage. *Applied Environmental Microbiology* **34**, 11-15.
- Niven, C. F., Brettner, L. G. and Evans, J. B. (1954). Thermal tolerance studies on the heterofermentative lactobacilli that cause greening of cured meat products. *Application of Microbiology* **2**, 26-29.
- Niven, C.F., Deibel, R.H. and Wilson, G.D. (1959). Production of fermented sausage. US Patent 2,907, 661.
- Nordal, J. and Slinde, E. (1980). Characteristic of some lactic acid bacteria used as starter cultures in dry sausage production. *Applied and Environmental Microbiology* **49**, 472-475.
- Nurmi, E. (1966). Effect of bacterial inoculations on characteristics and microbial flora of dry sausage. *Acta Agralia Fennica* **108**, 1-77.
- Nyckas, G.J.E. and Arkoudelos, J.S. (1990). Staphylococci: their role in fermented sausages. *Journal Applied Bacteriology* 167S-188S.
- O'Connell, M.B., Fransen, N.G., Schwarz, G. and Arendt, E.K. (1997). Influence of proteolytic starter cultures on the quality of fermented sausages. In: *Actes du Colloque Lactic 97*. 209-210.
- O'Boyle, A.R., Rubin, L.J., Diosady, L.L., Aladin-Kassam, N., Comer, F. and Brightwell, W. (1990). A nitrite-free curing system and its application to the production of wieners. *Food Technology* **44**, 88-103.
- Ockerman, H.W. (1972). *Quality control of post-mortem muscle tissue*. Dept. of Animal Science, The Ohio State University and Ohio Agricultural Research, U.S.A.
- Ordóñez, J.A., Asensio, M.A., Garcia, M.L., Selgas, M.D. and Sanz, B. (1989). A reasonably aseptic method of monitoring the phenomena occurring during the ripening of dry fermented sausages. *Fleischwirtschaft* **69**, 1023-1025.
-

- Ordóñez, J.A., Asensio, M.A., García, M.L., Selgas, M.D. and Sanz, B. (1990). A reasonable aseptic method of monitoring the phenomena occurring during the ripening of dry fermented sausages. *Fleischwirtschaft International*, 54-56.
- 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.
- Palumbo, S.A. and Smith, J.L. (1977). Chemical and microbiological changes during sausage fermentation and ripening. *American Chemical Society Symposium Series* **47**, 279-294.
- Palumbo, S.A., Zaika, L.L., Kissinger, J.C. and Smith, J.L. (1976). Microbiology and technology of the pepperoni process. *Journal of Food Science* **41**, 12-17.
- Papa, F., Zambonelli, C. and Grazia, L. (1995). Production of Milano style salami of good quality and safety. *Food Microbiology* **12**, 9-12.
- Papon, M. and Talon, R. (1988). Factors affecting growth and lipase production by meat lactobacilli strains and *Brochothrix thermosphacta*. *Journal of Applied Bacteriology* **64**, 107-115.
- Pascual, M.R. (1992). Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas. Ed. Díaz de Santos, S.A. Madrid.
- Pätäjä, E. (1977). The effect of some gram-negative bacteria on the ripening and quality of dry sausage. *Journal Science Agricultural Society Finland* **49**, 107-166.
- Pearson, D. (1968). Application of chemical methods for the assesment of beef quality. III.-Methods related to fat spoilage. *Journal of Science Food and Agriculture* **19**, 553-557
- Pederson, C.S. (1979). *Fermented sausage. Microbiology of Food Fermentations*, 2nd ed. AVI Publishing, Wesport, CT, USA, pp. 210-234.
- Pegg, R.B. and Shahidi, F. (1997). Unraveling the chemical identity of meat pigments. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **37**, 561-589.
- Pelosi, P. (1989). Some basic facts about dry sausage manufacture. *Fleischwirtschaft* **59**, 218-223.
- Pérez, S.R., Miura, H., Mikami, M. and Sekikawa, M. (1992). Action of isolated *Micrococcus* sp, *Pediococcus* sp and *Lactobacillus* sp. in fermented dry sausage. *Research Bulletin of Obihiro University I* **17**, 367-375.
- Pinheiro, A. J. R., Liska, B. J. and Parmelee, C. E. (1968). Properties of substances inhibitory to *Pseudomonas fragi* produced by *Streptococcus citrovorus* and *Streptococcus diacetylactis*. *Journal Dairy Science* **51. 2**, 183-187.
- Pohja, M.S. (1960). Micrococci in fermented meat products. *Acta Agralia Fennica* **96**, 1-80.
- Pozo, R. (1985). Microbiología de los productos cárnicos. *Alimentaria* **22**, 1-55.
- Prändl, O., Fischer, A., Schmidhofer, T. y Sinell, H.J. (1994). Embutidos crudos. En: *Tecnología e higiene de la carne*. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza. España. pp, 543-577.
- Presidencia del Gobierno. (1979). Métodos de análisis de productos cárnicos. *BOE* **207** de 29 de agosto de 1979.
- Presidencia del Gobierno. (1980). Norma de calidad para los productos cárnicos embutidos crudos-curados en el mercado interior. *BOE* **70** de 21 de marzo de 1980.
-

- Presidencia del Gobierno. (1986). Lista Positiva de aditivos y otros productos para uso en la elaboración de los productos cárnicos embutidos crudos-curados y para tratamiento de superficie de los mismos. *BOE 19 de 22 enero de 1986*.
- Presidencia del Gobierno. (1997). Lista Positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. *BOE 70 de 22 de marzo de 1997*.
- Pullen, M.M. and Genigeorgis, C. (1977). A study of coagulase positive staphylococci before fermentation. *Journal of Food Protection 47*, 354-358.
- Puolanne, E. (1977). Der einfluss von verringerten nitrit und nitratzusätzen auf die eigenschaften der rohwürst. *Journal Science Agricultural Society Findland 49*, 1-106.
- Raccach, M. (1981). Control of *Staphylococcus aureus* in dry sausage by newly developed meat starter culture and phenolic-type antioxidants. *Journal of Food Protection 44*, 665-669.
- Raccach, M. and Baker, R.C. (1978). Formation of hydrogen peroxide by meat starter cultures. *Journal of Food Protection 41*, 798-799.
- Raharjo, S., Sofos, J.N. and Schmidt, G.R. (1993). Solid-phase acid extraction improves thibarbituric acid method to determine lipid oxidation. *Journal of Food Science 58*, 921-924.
- Ramihone, M., Sirami, J., Larpent, J.P. et Girard, J.P. (1988). Gout acide des saucisson secs. *Viande Produits Carnes 9*, 291-298.
- Rammelsberg, M. and Radler, F. (1990). Antibacterial polypeptides of *Lactobacillus* species. *Journal of Applied Bacteriology 69*, 177-184.
- Rammelsberg, M., Muller, E. and Radler, F. (1990). Caseicin 80: purification and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus casei*. *Archive Microbiology 154*, 249-252.
- Rantala, M. and Nurmi, E. (1973). Prevention of the growth of *Salmonella infantis* in chicks by the flora of the alimentary tract of chicken. *Bromatology Poultry Science 14*, 627-630.
- Reddy, S. G. and Chen, M. L. (1975). Influence of lactic cultures on the biochemical, bacterial and organoleptic changes in beef. *Journal of Food Science 40*, 314-318.
- Reddy, S. G., Henrickson, R. L. and Olson, H. C. (1970). The influence of lactic cultures on ground beef quality. *Journal of Food Science 35*, 787-791.
- Requena, T. y Peláez, C. T. (1995). Revisión: Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos 35*, 19-44.
- Reuter, G. (1970). Laktobazillen und eng verwandte mikroorganismen in fleisch und fleischerzeugnissen. 2. Mitteilung: die charackterisierung der isolierten laktobazillen-stämme. *Fleischwirtschaft 47*, 397-402.
- Reuter, G. (1975). Classification problems, ecology and some biochemical activities of lactobacilli of meat products. In: *Lactic acid bacteria in beverages and foods*. Eds. J.G. Carr, C.V. Cutting and G.C. Whiting. Academic Press, London. pp. 221-229.
- Reuter, G., Langner, H.J. and Sinell, H.J. (1968). Entwicklung der mikroflora in schnellreinfender deutscher Rohwurst und analoge quantitative aminosäure analyse bei einer salami. *Fleischwirtschaft 48*, 170-176.
- Rincón, F., Zurera, G., Polo, L.M. y Pozo, R. (1983). Niveles de nitrito residual en embutidos y fiambres españoles. *Alimentaria 148*, 27-29.
- Roca, M. and Incze, K. (1990). Fermented sausages. *Food Reviews International 6*, 91-118.

- Rodríguez, J. M. (1996). Revisión: Espectro antimicrobiano, estructura, propiedades y modo de acción de la nisina, una bacteriocina producida por *Lactococcus lactis*. *Food Science and Technology International* **2**, 61-68.
- Rodríguez, J.M., Sobrino, O.J., Fernández, M.F., Cobos, A., Azcona, J.I., Hernández, P.E. y Sanz, B. (1988). Inhibición del crecimiento de diversos microorganismos por bacterias lácticas aisladas de embutidos crudos madurados. *VI Reunión Científica de Microbiología de los Alimentos*. Madrid, pp.76-77.
- Rodríguez, J.M., Sobrino, O.J., Moreira, W.L., Cintas, L.M., Casaus, P., Fernández, M.F., Sanz, B. and Hernández, P.E. (1994). Inhibition of *Yersinia enterocolitica* by *Lactobacillus sake* strains of meat origin. *Meat Science* **37**, 305-313.
- Rojas, F.J., Jodral, M., Gosalvez, F. and 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.
- Rosell, C.M. and Toldrá, F. (1996). Effect of curing agents on m-calpain activity throughout the curing process. *Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und Forschung* **203**, 320-325.
- Rosell, C.M., Flores, M. and Toldrá, F. (1996). Myoglobin as an endogenous inhibitor of proteolytic enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 3453-3456.
- Rozier, J. (1969). Mecanismos de la maturation du saucisson sec. *Recherche Médical et Vétérinaire* **145**, 1069-1102.
- Rubin, L.J. (1977). Nitrites and nitrosamines in perspective. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* **10(1)**, A11.
- Rubin, L.J., Diosady, L.L. and O'Boyle, A.,R. (1990). A nitrite-free meat-curing system. *Food Technology* **44**, 130.
- Rubin, L.J., Diosady, L.L., Shahidi, F. and Wood, D.F. (1985). Meat curing compositions and method of use. U.S. Patent 4,559,234.
- Sajber, C., Karacas, R. and Mitic, P. (1971). Influences of some starter cultures upon the changes in properties of stajer sausages during the fermentation. In: *Proc. 17th Eur. Meeting Meat Research Workers*. Bristol. pp, 744-760.
- Salih, M.A. (1985). Studies on growth metabolites produced by *Propionibacterium shermanii*. Ph.D. Thesis. Oregon State University, Corvallis.
- Salminen, S., Laine, M., von Wright, A., Vuopio-Varkila, J., Korhonen, T. and Mattila-Sandholm, T. (1996). Development of selection criteria for probiotics strains to assess their potential in functional foods: a nordic and european approach. *Bioscience Microflora* **15.2**, 61-67.
- Samelis, J., Aggelis, G. and Metaxopoulos, J. (1993). Lipolytic and microbial changes during the natural fermentation and ripening of Greek dry sausages. *Meat Science* **35**, 371-385.
- Samelis, J., Stavropoulos, S., Kakouri, A. and Metaxopoulos, J. (1994). Quantification and characterization of microbial populations associated with naturally fermented Greek dry salami. *Food Microbiology* **11**, 447-460.
- Sanz, B., Selgas, D., Parejo, I. and Ordóñez, J.A. (1988). Characteristic of lactobacilli isolated from dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* **6**, 199-205.
-

- Sanz, Y., Flores, J., Toldrá, F. and Ferial, A. (1997a). Effect of pre-ripening on microbial and chemical changes in dry fermented sausages. *Food Microbiology* **14**, 575-582.
- Sanz, Y., Vila, R., Toldrá, F., Nieto, P. and Flores, J. (1997b). Effect of nitrate and nitrite curing salts on microbial changes and sensory quality of rapid ripened sausages. *International Journal of Food Microbiology* **37**, 225-229.
- Sarasibar, B., Sanchez-Monge, J.M. y Bello, J. (1989). Influencia de nitratos y nitritos sobre la estabilidad del pimentón (*Capsicum annuum L.*) y el desarrollo del color en el chorizo de Pamplona. *Alimentaria* **207**, 19-23.
- Sárraga, C. (1992). Las enzimas proteolíticas en el jamón curado español. *Alimentación, equipos y tecnología* **11 (3)**, 81-85.
- Sárraga, C., Gil, M. and García-Regueiro, J.A. (1993). Comparison of calpain and cathepsin (B, L y D) activities during dry-cured ham processing from heavy and light large white pigs. *Journal of Science Food Agriculture* **62**, 71-75.
- Schalch, B., Eisgruber, H. and Stolle, A. (1996). Actual experiences with the microbiological requirements of the council directives for minced meats. *Meeting of Concerted Action CT94-1456*. Eds. M. H. Hinton y C. Rowlings. Bristol. U.K. 33-37.
- Schillinger, U. and Lücke, F.K. (1989a). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 1901-1906.
- Schillinger, U. and Lücke, F.K. (1989b). Inhibiting salmonellae growth in fresh spreadable Mettwurst. *Fleischwirtschaft* **69**, 879-882.
- Schillinger, U. y Lücke, F. K. (1991). El empleo de bacterias lácticas como cultivos protectores en productos cárnicos. *Fleischwirtschaft (español)* **1**, 35-40.
- Schillinger, U., Kaya, M. and Lücke, F.K. (1991). Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. *Journal of Applied Bacteriology* **70**, 473-478.
- Schleifer, K.H. (1986). Section 12. Gram-positive cocci. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. **2**. Eds. P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Schmidt, G.R. (1994). Comportamiento funcional de los componentes de la carne durante el procesado. En: *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos* (2ª edición). Eds. J.F. Price and B.S. Schweigert. Ed. Acribia. Zaragoza. pp. 377-391.
- Schmidt, G.R., Mawson, R.F. and Siegal, D.G. (1981). Functionality of a protein matrix in comminuted meat products. *Food Technology* **35**, 235-237.
- Schoebitz, R., Raddatz, M., Tamayo, R. and Miranda, C. (1995). Actividad antibacteriana de cepas lácticas aisladas a partir de carne envasada al vacío. *Fleischwirtschaft (español)* **2**, 12-19.
- Selgas, M.D., Ordóñez, J.A. and Sanz, B. (1986). Selection of micrococci strains for their use as starter cultures of dry fermented sausages. *Proceedings 32nd European Meeting Research Workers*. Ghent, pp. 251-254.
- Selgas, M.D., Sanz, B. and Ordóñez, J.A. (1988). Selected characteristics of micrococci isolated from Spanish dry fermented sausages. *Food Microbiology* **5**, 185-193.
- Serrano, A. (1979). Evolución de varias microfloras y su interdependencia con las condiciones físico-químicas durante la maduración del salchichón. *Alimentaria* **100**, 39-56.

- Shahidi, F., Rubin, L.J. and Wood, D.F. (1987). Control of lipid oxidation in cooked meats by combinations of antioxidants and chelators. *Food Chemistry* **23**, 151-154.
- Shahidi, F., Rubin, L.J. and Wood, D.F. (1988). Stabilization of meat lipids with nitrite-free curing mixtures. *Meat Science* **22**, 73-77.
- Shahidi, F., Rubin, L.J., Diosady, L.L. and Wood, D.F. (1985). Preparation of the cooked cured-meat pigment dinitrosyl ferrohemochrome from hemin and nitric oxide. *Journal of Food Science* **50**, 272-275.
- Shahidi, F., Rubin, L.J., Diosady, L.L., Chew, W. and Wood, D.F. (1984). Preparation of dinitrosyl ferrohemochrome from hemin and sodium nitrite. *Canadian Institute Food Science and Technology Journal* **17 (1)**, 33-36.
- Sharma, N. and Mukhopadhyay, R. (1995). Processing of fermented sausage. *Fleischwirtschaft* **75**, 452-454.
- Silla, M.H. (1989). Bacterias acidolácticas: Iniciadores fermentativos en productos cárnicos. *Revista de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos* **29**, 1-14.
- Silliker, J.H. and Gabis, D.A. (1986). Salmonella. In: *Advances in Meat Research, vol 2, Meat and Poultry Microbiology*. Eds. Pearson, A.M. and Dutson, T.R., AVI Publishing, Connecticut.
- Simonetti, P., Cantoni, C., Figeriu, R. and Prouera, D. (1983). Starter cultures and ripening of dry sausages. *Industria Alimentari* **22**, 614-617.
- Singh, B. J. and Dincho, D. (1994). Molds as protective cultures for raw dry sausages. *Journal of Food Protection* **57 (10)**, 928-930.
- Skovgaard, N. (1996). Starter cultures in the meat industry safety of the cultures and their benefits. *Meeting of Concerted Action CT94-1456*. Eds. M. H. Hinton y C. Rowlings. Bristol. U.K., pp. 141-145.
- Smith, G., Hole, M. and Hanson, S.W. (1990). Assesment of lipid oxidation in Indonesian salted-dried marine catfish (*Arius thalassimus*). *Journal Science Food Agriculture* **51**, 193-205.
- Smith, J. and Palumbo, S.A. (1973). Microbiology of lebagnon bologna. *Applied Microbiology* **26**, 489-496.
- Sorensen, B.B. and Samuelsen, H. (1996). The combined effects of environmental conditions on lipolysis of pork fat by lipases of the meat starter culture organisms *Staphylococcus xylosus* and *Debaromyces hansenii*. *International Journal of Food Microbiology* **32**, 59-71.
- Sorrells, K. M. and Speck, M. L. (1970). Inhibition of *Salmonella gallinarum* by culture filtrates of *Leuconostoc citrovorum*. *Journal Dairy Science* **53(2)**, 239-240.
- Speck, M. L. (1972). Control of food-borne pathogens by starter cultures. *Journal of Dairy Science* **55(7)**, 1019-1022.
- Spelhaug, S.R. and Harlander, S.K. (1989). Inhibition of foodborne pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. *Journal of Food Protection* **52**, 856-862.
- Stahnke, L.H. (1995a). Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredient levels. Part I. Chemical and bacteriological data. *Meat Science* **41**, 179-191.
- Stahnke, L.H. (1995b). Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredient levels. Part II. Volatile components. *Meat Science* **41**, 193-209.
-

- Stevens, K.A., Klapes, N.A., Sheldon, B. and Klaenhammer, T.R. (1991). Nisin treatment for the inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 3613-3615.
- Stevens, K.A., Klapes, N.A., Sheldon, B. and Klaenhammer, T.R. (1992). Antimicrobial action of nisin against *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide mutants. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 1786-1788.
- Stiebing, A. and Rödel, W. (1988). Influence of relative humidity on the ripening of dry sausage. *Fleischwirtschaft* **68**, 1287-1291.
- Stiles, M.E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular microbiology* **70**, 331-345.
- Talon, R., Walter, D. and Montel, M.C. (1998). Effect of staphylococci and lactic acid bacteria on the oxidation of unsaturated free fatty acids. *44th International Congress of Meat Science and Technology*. Barcelona, Spain, pp. 796-797.
- Tarladgis, B.G., Pearson, A.M. and Dugan, L.R. (1964). Chemistry of the 2-thiobarbituric acid test for determination of oxidative rancidity in foods. II.- Formation of the TBA-Malonaldehyde complex without acid-heat treatment. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **15**, 602-607.
- Tarladgis, B.G., Watts, B.M. and Younathan, M.T. (1960). A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *Journal American Oil Chemistry Society* **37**, 44-48.
- Tichaczek, P.S., Meyer, J.N., Nes, R.F., Vogel, R.F. and Hammes, W.P. (1992). Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *L. sake* LTH673. *Systematic Applied Microbiology* **15**, 460-468.
- Toldrá, F. (1998). Proteolysis and lipolysis in flavor development of dry-cured meat products. *Meat Science* **49**, 101-110.
- Toldrá, F. and Etherington, D.J. (1988). Examination of cathepsins B, D, H and L activities in dry-cured hams. *Meat Science* **23**, 1-7.
- Toldrá, F. and Flores, M. (1998). The role of muscle proteases and lipases in flavor development during the processing of dry-cured ham. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **38**, 331-352.
- Toldrá, F., Motilva, M.J., Aristoy, M.C. and Flores, J. (1992). Lipase, esterase and aminopeptidase activities in raw pork adipose tissue. In: *38th ICoMST*. Clermont-Ferrand, France. pp. 609-612.
- Toldrá, F., Rico, E. y Flores, J. (1993). Cathepsins B, D, H y L activities in the processing of dry-cured ham. *Journal of Science Food Agriculture* **62**, 157-161.
- Torregrosa, A., Fagoaga, F., Moreno, P. y García, M. (1994). Incidencia de *Salmonella sp.* en productos cárnicos. *Alimentaria* **254**, 27-298.
- UNE 55-023-73. (1973). Materias grasas. Índice de peróxidos. AENOR. Ministerio de Industria. Madrid.
- Valladares, C., Roca, M., Ramos, M., Ramos, R. y González, E. (1993). Efecto del proceso tecnológico sobre la salmonella en productos crudos fermentados. *Alimentaria* **245**, 33-35.
-

- Van Netten, P., Perales, I., Van de Moosdijk, A., Curtis, G.D. and Mossel, D.A. (1989). Liquid and solid selective differential media for detection and enumeration of *L. monocytogenes* and other *Listeria spp.* *International Journal of Food Microbiology* **8**, 299-316.
- Varnam, A.H. and Evans, M.G. (1991). Foodborne Pathogens. In: *London Wolfe Publishing*, London, UK.
- Ventanas, J., Córdoba, J.J., Antequera, T., García, C., López-Bote, C. and Asensio, M. (1992). Hydrolysis and Maillard reactions during ripening of Iberian ham. *Journal of Food Science* **57**, 813-815.
- Verplaetse, A. (1994). Influence of raw meat properties and processing technology on aroma quality of raw fermented meat products. In: *Proc. 40th International Congress of Meat Science and Technology*. La Haya. pp. 45-65.
- Verplaetse, A., De Bosschere, M. and Demeyer, D. (1989). Proteolysis during dry sausage ripening. In: *Proc. 35th International Congress of Meat Science and Technology*. Copenhagen. pp, 815-818.
- Verplaetse, A., Demeyer, D., Gerard, S. and Buys, E. (1992). Endogenous and bacterial proteolysis in dry sausage fermentation. In: *Proceedings of the 38th International Congress of Meat Science and Technology*, vol. 4, Clermont-Ferrand, France, pp. 851-854.
- Vignolo, G.M., Ruiz Holgado, A.P. and Oliver, G. (1988). Acid production and proteolytic activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry sausages. *Journal of Food Protection* **51**, 481-484.
- Virgili, R., Parolari, G., Soresi, C. and Schivazappa, C. (1997). Sensory and analytical investigations into six types of European hams: Parma, Serrano, Bayonne, Italian country-style, Iberian and Corsican. *Industria Conserve* **72**, 134-143.
- Vogel, R.F., Lohmann, M., Nguyen, M., Weller, A.N. and Hammes, W.P. (1993). Molecular characterization of *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sake* isolated from sauerkraut and their application in sausage fermentations. *Journal or Applied Bacteriology* **74**, 295-300.
- Walters, C.L., Casselden, R.J. and Taylor, A.M. (1967). Nitrite metabolism by skeletal muscle mitochondria in relation to haem pigments. *Biochemistry and Biophysics Acta* **143**, 310-317.
- Wardlaw, F.B., Skelley, G.C., Johnson, M.G. and Acton, J.C. (1973). Changes in meat components during fermentation heat processing and drying of a summer sausage. *Journal of Food Science* **38**, 1228-1231.
- Weber, G.H. and Broich, W.A. (1986). Shelf life extension of cultured dairy foods. *Cultures Dairy Production Journal* **21**, 19-23.
- Weidenfeller, P. and 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.
- Wirth, F. (1991). Restricting and dispensing with curing agents in meat products. *Fleischwirtschaft* **71**, 1051-1054.
- Wolf, G. and Hammes, W. P. (1988). Effect of hematin on the activities of the nitrite reductase and catalase in lactobacilli. *Archive Microbiology* **149**, 220-224.
- Wood, D.S., Collins-Thompson, D.L., Osborne, W.R. and Picard, B. (1986). An evaluation of antibotulinal activity in nitrite-free curing systems containing dinitrosyl ferrohemochrome. *Journal of Food Protection* **49**, 691-695.
-

Yousef, A.E., Luchansky, J.B., Degnan, A.J. and Doyle, M.P. (1991). Behavior of *Listeria monocytogenes* in wiener exudates in the presence of *Pediococcus acidilactici* or Pediocin AcH during storage at 4 or 25°C. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 1461-1467.

Yun, J., Shahidi, F., Rubin, L.J. and Diosady, L.L. (1987). Oxidative stability and flavour acceptability of nitrite-free meat curing systems. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* **20**, 246-249.

Zambonelli, C., Papa, F., Roman, P., Suzzi, G. e Grazia, L. (1992). In: *Microbiologia dei salami*. Ed. Edagricole. Bologna.

Zeuthen, P. (1995). Historical aspects of meat fermentations. In: *Fermented Meats*. Eds. Campbell-Platt, G. y Cook, P.E. Chapman & Hall. Glasgow. pp. 53-68.
