

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

**“Caracterización de la microbiota específica
de la Marca Colectiva Chorizo Asturiano”**

TRABAJO FIN DE MASTER

POR

NATALIA PRADO MARRÓN

JULIO, 2013



CERTIFICADO



Master en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Julian Clavería s/n. 33871 Oviedo, España
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviado.es/MBTA>



PROFESOR TUTOR:

Dr. D. Juan Díaz García

CERTIFICA:

Que Dña. **Natalia Prado Marrón** ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 7ª promoción curso 2012-2013.

Oviedo, de 19 de julio 2013

D. (Tutor)



VºBº

Mario Díaz Fernández

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer la ejecución de este proyecto a toda la plantilla de la Asociación de Investigación de Industrias Cárnicas del Principado de Asturias (ASINCAR), en especial a mis compañeros del laboratorio por toda la ayuda prestada en el desarrollo y ejecución del mismo.

También un especial agradecimiento a Juan Díaz, Gerente de ASINCAR y a Pelayo González, Director del Laboratorio, por sus ánimos, su paciencia y su confianza en mí.

No quisiera olvidarme de mi familia, en especial mis padres por su apoyo, a Nacho sencillamente por todo y a mi pequeña, Alicia.

El presente proyecto IDE/2011/000708 ha sido cofinanciado por el IDEPA dentro del programa de ayudas dirigidas a agrupaciones empresariales innovadoras (CLUSTERS) del Principado de Asturias.



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. Objetivos del proyecto	11
2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES	12
2.1 Reglamento de uso del Chorizo Asturiano	12
2.2 Marco legislativo	12
2.2.1 Criterios de calidad.....	12
2.2.2 Criterios microbiológicos.....	13
2.3 Marco normativo.....	14
3. METODOLOGÍA.....	18
3.1 Segmentación de las muestras y evaluación sensorial	18
3.2 Análisis físico-químicos.....	20
3.2.1 Determinación de pH y actividad de agua (a_w)	20
3.2.2 Determinación del contenido de sodio	21
3.2.3 Determinación de la humedad.....	21
3.2.4 Determinación de cenizas	22
3.2.5 Determinación de proteína	22
3.2.5 Determinación de grasa	23
3.3 Análisis microbiológicos	23
3.3.1 Determinación de microbiota patógena.....	24
3.3.2 Determinación de microbiota beneficiosa.....	28
3.4 Aislamiento, conservación y caracterización de cepas aisladas	29
3.4.1 Aislamiento de cepas de interés tecnológico.....	29
3.4.2 Conservación de cepas de interés tecnológico.....	30
3.4.3 Caracterización de los aislados	31
3.5 Evaluación del potencial de los diferentes aislados como cultivos iniciadores.....	34

3.5.1 Determinación de requerimientos nutricionales	34
4. RESULTADOS EXPERIMENTALES.....	36
4.1 Determinación de pH y a_w	36
4.2 Determinación del contenido de Na.	37
4.3. Determinación del perfil nutricional	38
4.4 Determinación de microbiota patógena.....	39
4.5 Determinación de microbiota beneficiosa.....	40
4.6 Caracterización de BAL.....	41
4.7 Caracterización de CGC+	42
4.8 Determinación de requerimientos nutricionales.....	43
5. CONCLUSIONES	46
6. SÍMBOLOS.....	50
7. BIBLIOGRAFÍA	52
ANEXO I – FICHA DE CATA.....	54

RESUMEN

La fermentación de alimentos es uno de los procesos biotecnológicos más antiguos. La elaboración del Chorizo Asturiano, producto con gran relevancia industrial dentro del sector cárnico asturiano, requiere de un proceso fermentativo seguido de una etapa de maduración en la que se desarrollan las propiedades organolépticas típicas del producto, consecuencia de la actividad de los microorganismos. Tradicionalmente los microorganismos presentes en la masa, los propios de la carne y aquellos derivados de las actividades de manipulación y del ambiente industrial, desarrollaban los procesos fermentativos. Sin embargo no todos los microorganismos presentes en las materias primas contribuyen a la maduración prevista. Además de microorganismos beneficiosos que conducen a la fermentación y que influyen de manera positiva en el producto, también pueden desarrollarse microorganismos alterantes o responsables del deterioro y microorganismos patógenos.

El objetivo principal del presente trabajo es el conocimiento y caracterización de las principales comunidades bacterianas con posible interés tecnológico en el Chorizo Asturiano englobado dentro de la Marca Colectiva, para evaluar el posible desarrollo de cultivos iniciadores específicos, ya que, aunque los productos cárnicos fermentados se pueden elaborar sin cultivos iniciadores, éstos ofrecen una serie de ventajas. Entre éstas destacarían disminuir el tiempo de fermentación, garantizar la seguridad alimentaria inhibiendo parcialmente el desarrollo de microbiota alterante y/o patógena y asegurando la calidad. Además el desarrollo de cultivos iniciadores específicos para el Chorizo Asturiano permitiría obtener un producto homogéneo y de alta calidad, manteniendo sus propiedades organolépticas, individualizando y diferenciando el producto de otros similares de distintos orígenes, haciendo las producciones más rentables y manteniendo la personalidad propia de este embutido.

Tras el desarrollo del presente trabajo se concluye que existe una microbiota bacteriana predominante y común a la mayor parte de los fabricantes de la Marca Colectiva Chorizo Asturiano y sus características tecnológicas pueden permitir el desarrollo futuro de un cultivo iniciador específico.

ABSTRACT

The food fermentation is one of the most ancient biotechnological processes. The production of the Asturian Sausage has a great industrial relevancy inside the Asturian meat sector. The manufacture of this product needs a fermentative process, followed by a stage of maturation to get their typical sensorial properties. Traditionally, the microorganisms present in the meat or derivatives of different activities like manipulation, industrial environment, etc. were responsible about the fermentative processes. The problem is that not all the present microorganisms in the raw materials contribute to a good fermentation processes, and sometimes microorganisms are responsible for the product deterioration or in several times the presence of pathogenic microorganisms.

The characterization of the microbiological communities is the main objective in this project. After that it was evaluated the possible technological interesting in the Asturian Sausage for development specific cultures for the fermentation.

The Asturian Sausage manufacture with specific cultures, offer a series of advantages: reduce de fermentation time, guaranty de microbiological safety and assure the quality.

In addition the development of specific microbiological cultures for the Asturian Sausage would allow to obtain a homogeneous product with a high quality, individualizing the product from similar others and supporting the own personality of this product.

After the development of the present work, we conclude that exists a predominant and common microorganisms in the most of the manufacturers of Asturian Sausage and his technological characteristics can allow the future development of microbiological specific cultures.

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Logotipo de la Marca Colectiva Chorizo Asturiano.....	12
Figura 2. Esquema de trabajo para la creación del panel de cata del Chorizo Asturiano.....	19
Figura 3. % de identificación por especies de los aislados pertenecientes al grupo de BAL.....	48
Tabla 1. Pruebas bioquímicas empleadas para la identificación de BAL.....	32
Tabla 2. Pruebas bioquímicas empleadas para la identificación de los CGC+.....	33
Tabla 3. Media de los valores de pH y a_w obtenidos en las muestras.....	36
Tabla 4. Media de los valores de Na obtenidos en las muestras.....	37
Tabla 5. Media de los valores del contenido en macro-nutrientes.....	38
Tabla 6. Resultados obtenidos del análisis de patógenos.....	39
Tabla 7. Resultados obtenidos del recuento de BAL y CGC+.....	40
Tabla 8. Microorganismos identificados tras las pruebas de identificación bioquímica dentro del grupo de BAL.....	41
Tabla 9. Microorganismos identificados tras las pruebas de identificación bioquímica dentro del grupo de los CGC+.....	42
Tabla 10. Requerimientos nutricionales de las BAL identificadas.....	43
Tabla 11. Requerimientos nutricionales de los CGC+ identificadas.....	45

1. INTRODUCCIÓN

En el sector Agroalimentario, al igual que en otros ámbitos y sectores, existe una búsqueda de la calidad por parte del consumidor. El sector cárnico es sensible a esta nueva demanda del consumidor y, en los últimos años, han ido incrementando el número de productos vinculados a sellos de calidad diferenciada, ya sea mediante certificación privada, de acuerdo con la legislación autonómica o por la adscripción a las normas de calidad que reconoce la Unión Europea.

La Calidad Alimentaria Diferenciada es una cuestión bastante subjetiva, ya que además de contemplar criterios higiénico-sanitarios, se consideran también determinantes otros aspectos relacionadas con la calidad tales como:

- Características específicas de los productos ligadas a su origen geográfico o zona de producción.
- Métodos de producción tradicionales.
- Ingredientes especiales.

Todo esto hace que los operadores de la Industria Agroalimentaria busquen un elemento diferenciador en sus productos para poder dar una mayor calidad a los consumidores, cada vez más exigentes.

El interés por parte de los fabricantes de elaborar productos de Calidad Alimentaria Diferenciada puede ser debida a distintos fines como:

- Incremento del valor añadido de los alimentos y de las materias y elementos alimentarios.
- Mejora de la competitividad de los alimentos y de las materias y elementos alimentarios en el mercado global.
- Diversificación de la economía de las zonas rurales.
- Reconocimiento de los valores culturales que vinculan determinadas maneras de producción de una zona concreta.

Actualmente existe una Marca Colectiva para el Chorizo Asturiano. El objetivo fundamental es proteger un producto tradicionalmente elaborado en el Principado de Asturias para evitar su fabricación y etiquetado como tal por cualquier industria fuera de la región, ya que esto conllevaría una pérdida de patrimonio para la Comunidad Autónoma y un posible perjuicio para los industriales cárnicos asturianos.

Por otro lado, la fermentación de alimentos es uno de los procesos biotecnológicos más antiguos. En los procesos fermentativos tiene una participación decisiva la microbiota presente en cada producto; los microorganismos fermentadores no sólo participan en la estabilidad microbiológica del alimento fermentado, sino que también contribuyen a sus propiedades organolépticas.

En España se elaboran y consumen una gran cantidad de productos cárnicos típicos originarios de cada una de las regiones, como es el caso del Chorizo Asturiano.

Los embutidos crudo-curados son productos cárnicos, troceados o no, adicionados de sal y otras sustancias, que se someten a un proceso de maduración-secado apropiado y, opcionalmente, ahumado.

Cuando su fabricación depende de la acción de microorganismos bien incorporados en forma de cultivos iniciadores o presentes en las materias primas y/o ambiente de producción, estos productos se denominan también productos fermentados.

El Chorizo Asturiano se elabora a partir de carnes picadas de cerdo o cerdo y vacuno, con adición de sal, pimentón y otras especias, condimentos y aditivos autorizados. La mezcla de los ingredientes es amasada y embutida en tripas naturales o artificiales y posteriormente se somete a un proceso de maduración-secado y ahumado. El producto resultante se caracteriza por su coloración roja y por su olor y gusto característicos. [14]

La obtención de un embutido fermentado de calidad requiere un proceso fermentativo en el que se produce un descenso de pH y una etapa de maduración en la que se desarrollan el aroma y textura típicos como consecuencia de los numerosos procesos químicos y enzimáticos que tienen lugar. También es imprescindible la subsiguiente fase de desecación, ya que en ella se produce una reducción de la a_w que en

combinación con la disminución del pH hace que el embutido adquiera su capacidad de conservación, además de la consistencia adecuada y la ligazón de la masa. [4]

Los microorganismos desempeñan un papel decisivo en la fabricación de embutidos fermentados, ya que están directamente implicados en la reducción de nitratos a nitritos, el descenso de pH, la formación del aroma, la estabilidad del color y la capacidad de conservación del producto. Además esta microbiota acaba instaurándose como microbiota predominante, excluyendo a la indeseable, a la par que ejercen un efecto conservador frente a microorganismos patógenos y alterantes. De forma tradicional, son los microorganismos presentes en la materia prima y en el ambiente de las instalaciones los que de manera natural colonizaban los productos y desarrollaban los procesos fermentativos.

Sin embargo, no todos los microorganismos presentes en las materias primas contribuyen a la maduración prevista, y algunos de ellos pueden derivarla hacia una dirección indeseable. Para corregir posibles defectos en la maduración del producto, en numerosas ocasiones se opta por utilizar cultivos de microorganismos seleccionados que influyen de manera beneficiosa sobre la fermentación del embutido, además de inhibir el desarrollo de la microbiota alterante que normalmente llega a la masa del embutido procedente de la materia prima o en el transcurso de la fabricación.

Los cultivos iniciadores son cultivos microbianos con propiedades acidificantes, protectoras y saborizantes, seleccionados por su actividad enzimática, que agregados en una proporción definida, producen la transformación deseada de la masa cárnica en producto crudo-curado. Los cultivos iniciadores son por tanto una cepa o mezcla de cepas, que cumplen diferentes aspectos relacionados con la obtención de productos cárnicos fermentados con adecuadas características higiénicas y organolépticas. [5]

Aunque los productos cárnicos fermentados se pueden elaborar sin cultivos iniciadores (microbiota natural de la carne), éstos ofrecen una serie de ventajas por las que son utilizados:

- Disminuyen el tiempo de fermentación.

- Garantizan la seguridad. Permiten controlar la ecología microbiana gracias al ácido láctico producido, inhibiendo parcialmente el desarrollo de microbiota alterante y/o patógena.
- Aseguran la calidad.

Además de las ventajas anteriormente descritas, el desarrollo de cultivos iniciadores específicos para el Chorizo Asturiano permitiría:

- Obtener un producto homogéneo y de alta calidad.
- Adecuar las características organolépticas deseadas.
- Obtener una alta aceptabilidad del producto final.

Actualmente existen cultivos iniciadores en el mercado, pero ninguno específico para el Chorizo Asturiano.

1.1. Objetivos del proyecto

Objetivo principal:

Con el presente proyecto se pretende conocer y caracterizar la microbiota propia del Chorizo Asturiano, encuadrado en la Marca Colectiva y su posterior evaluación para el desarrollo futuro de cultivos iniciadores propios y específicos para la elaboración de dicho embutido, de forma que se consiga la estandarización del producto, manteniendo sus propiedades organolépticas, individualizando y diferenciando el producto de otros similares de diferentes orígenes, haciendo las producciones más homogéneas, rentables y manteniendo la personalidad propia de este embutido.

Objetivos secundarios:

- Estudio y caracterización de las principales comunidades bacterianas de interés tecnológico en el Chorizo Asturiano.
- Evaluación del potencial de las principales comunidades bacterianas de microbiota beneficiosa para la obtención de cultivos iniciadores.

2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES

2.1 Reglamento de uso del Chorizo Asturiano

Tal y como aparece definido en el reglamento de uso, la Marca Colectiva "Chorizo Asturiano", es el signo que certifica la calidad y origen de los chorizos autorizados y controlados por ASINCAR, entendiéndose como tal el producto cárnico elaborado con mezcla de carnes picadas o troceadas de cerdo y/o vacuno o ambas adicionada de sal, pimentón y otras especias, amasada y embutida que ha sufrido un proceso de maduración – desecación con ahumado natural. [14]

La zona de producción y acondicionamiento de los productos amparados dentro de la Marca Colectiva "Chorizo Asturiano" se encuentra situada en la Comunidad Autónoma del Principado de Asturias.

Los productos englobados dentro de la marca deberán cumplir una serie de parámetros físico-químicos y microbiológicos establecidos en consonancia con la legislación vigente.



Figura 1. Logotipo de la Marca Colectiva Chorizo Asturiano

2.2 Marco legislativo

2.2.1 Criterios de calidad

Orden de 7 de febrero de 1980 por la que se aprueba la norma de calidad para los productos cárnicos embutidos crudo-curados. [12]

Esta es la normativa actualmente vigente que regula las características, de calidad, envasado y presentación que deben reunir los productos cárnicos embutidos crudos para su adecuada comercialización.

Los embutidos incluidos en el proyecto se fabricaron en todos los casos de acuerdo dicha norma. En las características generales del producto se establecen aspectos relacionados con las propiedades organolépticas del producto o la descripción del corte que debe presentar "... homogéneo, liso y bien ligado, sin coloraciones anormales y con una diferenciación neta entre fragmentos de carne y tocino o grasa..." características en las que tiene una influencia el desarrollo de procesos fermentativos de forma adecuada y que se produzca así una correcta ligazón de la masa.

No obstante, actualmente se encuentra en vías de desarrollo la futura norma de calidad de productos cárnicos en base a la cual se regulará el Chorizo Asturiano.

2.2.2 Criterios microbiológicos

Reglamento (CE) Nº 2073/2005, Relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios y su posterior modificación, Reglamento (CE) Nº 1441/2007). [13]

Atendiendo a la reglamentación vigente y reflejado en el Anexo I del Reglamento 2073/2005 se entiende que son de aplicación para el Chorizo Asturiano los criterios microbiológicos descritos a continuación.

En cuanto a los criterios de seguridad alimentaria definidos en el Capítulo 1 del mencionado anexo serían aplicables los siguientes puntos:

1.8. Productos cárnicos destinados a ser consumidos crudos, excluidos los productos en los que el proceso de fabricación o la composición del producto elimine el riesgo de *Salmonella*. El microorganismo a determinar sería por tanto *Salmonella*, estableciendo como límite Ausencia en 25 de producto y con aplicabilidad de dicho criterio en productos comercializados a lo largo de su vida útil.

1.3. Alimentos listos para el consumo que no pueden favorecer el desarrollo de *Listeria monocytogenes*, que no sean destinados a los lactantes ni para usos médicos

especiales. Se considera que los productos que no favorecen el desarrollo del patógeno son aquellos con $\text{pH} \leq 4.4$ ó $a_w \leq 0.92$, productos con $\text{pH} \leq 5.0$ y $a_w \leq 0.94$ y los productos con una vida útil inferior a 5 días. En el estudio se comprobará que el Chorizo Asturiano pertenece a esta categoría, debido principalmente a que en todos los casos los valores de a_w son inferiores a 0.94. Por ello el criterio microbiológico establecido será el de recuento de *Listeria monocytogenes*, con un límite de 100 ufc/g y con aplicabilidad del criterio en productos comercializados a lo largo de su vida útil.

Para los criterios de higiene de los procesos, definidos en el Capítulo 2, se considerará aplicable el siguiente punto:

2.1.8. Preparados de carne. El microorganismo definido en este caso para la evaluación de la higiene de los procesos será *E. coli*, utilizado este parámetro microbiológico como indicador de posible contaminación fecal. Los límites establecidos están entre 500 ufc/g y 5000 ufc/g. La fase en la que se aplicaría el criterio sería al final del proceso de fabricación, una vez que el producto está listo para el consumidor.

2.3 Marco normativo

Para la realización de muchas de las determinaciones microbiológicas realizadas en el estudio se emplearon como métodos de referencia los descritos para tal fin en la serie ISO. La abundante normativa ISO existente a tal efecto no trata si no, armonizar los métodos microbiológicos de análisis de alimentos a nivel internacional.

Las principales normas utilizadas como referencia en el presente proyecto son las referenciadas a continuación:

ISO 17025:2005. “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración”. [11]

En esta norma quedan establecidos los requisitos generales mediante los que se establece la competencia técnica de ensayos y calibraciones. Esta norma es aplicable a todos los laboratorios con independencia de la naturaleza de sus actividades de ensayo y/o calibración y supone una norma como referencia para clientes, autoridades y entidades acreditadoras cuando reconocen la competencia de los laboratorios.

El laboratorio de ASINCAR, en el que el presente proyecto ha sido desarrollado, está acreditado bajo dicha norma.

ISO 7218:2007. “Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Requisitos generales y guía para el examen microbiológico”. [9]

Esta es la norma de referencia para cualquier laboratorio de análisis microbiológico de alimentos y la más importante en este aspecto. Esta norma internacional indica los requisitos generales y ofrece una guía orientativa con tres objetivos principales:

- 1) Implementación de las normas para la detección o el recuento de los microorganismos
- 2) Establecer las buenas prácticas de laboratorio en los laboratorios de microbiología de los alimentos
- 3) Ser una guía orientativa para la acreditación de los laboratorios de microbiología de los alimentos.

Abarca el análisis de bacterias, levaduras y mohos, pero no cubre el análisis de toxinas u otros metabolitos de los microorganismos. Su objeto es el de ayudar a asegurar la validez de los análisis microbiológicos de los alimentos, colaborar en la aseguración de que las técnicas generales que se utilizan para realizar dichos análisis sean las mismas en todos los laboratorios, ayudar a conseguir unos resultados homogéneos en todos los laboratorios y contribuir a la seguridad del personal del laboratorio y prevenir así los riesgos de que se produzcan infecciones.

ISO 6887-1 “Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico” e ISO 6887-2, “Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico, parte 2, reglas específicas para la preparación de carnes y productos cárnicos”. [8]

En la norma ISO 6887-1 vienen descritas aquellas operaciones a realizar para la obtención de la porción analítica en condiciones asépticas, requisito imprescindible para la realización de análisis microbiológicos. En la misma viene detallada la forma de proceder para la preparación de la dilución madre, homogenización de la muestra y la realización de diluciones decimales seriadas.

En la Norma ISO 6887-2 se describen las reglas específicas para la preparación de las muestras de carne y productos cárnicos y de las suspensiones para el examen microbiológico, describiendo de forma específica como tratar matrices pertenecientes a la categoría de productos cárnicos curados o fermentados.

ISO 6579:2002 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.” [7]

Para la determinación de *Salmonella* spp. en el Chorizo Asturiano se siguieron las pautas definidas en la correspondiente norma ISO para la investigación del patógeno. En el mismo se establece para la detección de *Salmonella* cuatro etapas sucesivas que requieren enriquecimientos previos de la muestra en medio líquido general y de carácter selectivo y todas las etapas necesarias para su identificación.

ISO 1649-1:2001 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la enumeración de *E. coli* β -glucuronidasa positiva”. [6]

Para la determinación de *E. coli* β -glucuronidasa + en el Chorizo Asturiano se siguieron las pautas definidas en la correspondiente norma ISO para la investigación y recuento del microorganismo del patógeno. El método se basa en el empleo de un medio de cultivo que contiene un sustrato cromogénico para el revelado de la actividad β -glucuronidasa.

Validación AFNOR Protocolo 520080:01/04/2010, “Método para el recuento de *Listeria monocytogenes*”, ISO 11290-1 e ISO 11290-2 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes*”. [15]

Para la investigación y recuento se empleó un método alternativo descrito en el protocolo AFNOR mencionado y basado en el uso de un medio cromogénico, ALOA, que permite la detección de colonias con actividad β -glucosidasa gracias a un sustrato cromogénico específico, presentando además las colonias de *Listeria monocytogenes* un halo opaco, vinculado a la actividad de una fosfolipasa implicada en el proceso infeccioso de la bacteria.

Para las pruebas de confirmación e identificación se emplearon las directrices descritas en las normas ISO 11290-1 e ISO 11290-2.

ISO 15214:1998 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la enumeración de bacterias ácido lácticas. Técnica de recuento de colonias a 30 °C”. [10]

En el caso de investigación y recuento de bacterias ácido lácticas en condiciones de mesofilia se aplicó la técnica de recuento de colonias a 30 °C en los medios y condiciones especificadas en la norma mencionada.

3. METODOLOGÍA

3.1 Segmentación de las muestras y evaluación sensorial

Se llevó a cabo una segmentación de las muestras a incluir en el estudio siguiendo los siguientes criterios generales:

- Formar parte de la Marca Colectiva Chorizo Asturiano, lo que garantiza las condiciones de elaboración del producto en base a la receta de Chorizo Asturiano, siguiendo las premisas del reglamento de uso y por tanto sometido a las inspecciones y controles establecidos en dicho reglamento.
- Interés de las empresas en caracterizar la microbiota propia de sus productos e interesadas en el desarrollo y empleo de cultivos iniciadores.
- Producto representativo por sus condiciones de elaboración (como se mencionó anteriormente, las establecidas en el reglamento de uso), su localización geográfica o por sus características organolépticas.

La toma de muestras se llevó a cabo tratando de asegurar en todo momento que dicho proceso y el posterior almacenamiento de las mismas no invalidaran los resultados del estudio.

Se realizó una selección mediante una evaluación sensorial de la muestras, eligiendo de esta forma aquellas representativas de la Marca Colectiva.

Ninguna de las muestras presentaba defectos y/o alteraciones tales como rancidez, pérdida de color, mohos en superficie, indicios de alteración microbiana, etc...

Todas las muestras seleccionadas presentaban un grado de fermentación, maduración y ahumado característico del Chorizo Asturiano, lo que será corroborado posteriormente gracias a los análisis físico-químicos de pH, a_w y humedad.

Uno de los criterios clave para la selección de las muestras y por tanto su inclusión en la caracterización microbiológica, fue la evaluación organoléptica de las mismas determinado aquellos productos que representan las características del Chorizo Asturiano.

Para ello se desarrolló un panel de cata entrenado en el producto, formado finalmente por un total de seis miembros y siguiendo el siguiente esquema de trabajo:



Figura 2. Esquema de trabajo para la creación del panel de cata del Chorizo Asturiano

Los atributos de calidad valorados fueron:

- Color
- Olor
- Flavor
- Textura

Los descriptores analizados dentro de cada uno de los atributos de calidad fueron:

- Color: intensidad de color desde naranja a rojo oscuro.
- Olor: olor a carne fresca/curada, olor a pimentón, olor a especias (ajo, pimienta, etc...), olor ahumado.
- Flavor: sabor ácido, sabor a carne fresca/curada, sabor a pimentón, sabor a especias, sabor ahumado.
- Textura: cohesividad de la loncha, grado de curación, jugosidad, untuosidad y masticabilidad.

Se incluyó además una valoración hedónica del producto donde se trató de buscar la valoración global del producto por parte de los jueces del panel y evaluar así el grado de aceptación o de preferencia.

La ficha de cata desarrollada está incluida en el Anexo I del presente documento.

El número de muestras seleccionadas finalmente para su caracterización físico-química y microbiológica y evaluación tecnológica de su microbiota fueron 15.

Una vez seleccionadas las muestras, para los análisis microbiológicos se siguieron las especificaciones descritas en las normativas ISO 6887-1 e ISO 6887-2. La porción de muestra no empleada en los análisis microbiológicos fue homogeneizada y congelada a -18 ± 2 °C para su posterior caracterización a nivel físico-químico.

3.2 Análisis físico-químicos

Previo a la realización de los análisis físico-químicos se realizó una preparación previa de las muestras de manera que fueron homogeneizadas en un triturador, ya que las características del Chorizo Asturiano hace que no sea homogéneo en todos sus puntos.

Las muestras congeladas se descongelaron en condiciones de refrigeración.

3.2.1 Determinación de pH y actividad de agua (a_w)

En todas las muestras incluidas en el estudio se determinaron pH y a_w ya que ambos parámetros son de enorme importancia en el crecimiento microbiano.

Los métodos empleados para la determinación están basados en los procedimientos normalizados de trabajo PNT-FQ-014 para determinación de pH por método potenciométrico y PNT-MB-FQ-019 para determinación de la a_w .

Para todos los microorganismos existe un óptimo de pH en que su nivel de proliferación es máximo, siendo para la mayoría de los microorganismos un valor próximo a la neutralidad, mientras que para determinada microbiota bacteriana, como es el caso de las bacterias ácido lácticas, el óptimo de pH es entre 4-8.

La determinación del pH se realizó mediante medida directa sobre las muestras homogeneizadas con un electrodo de penetración de membrana de vidrio. El potencial

producido en el sistema del electrodo de vidrio varía linealmente con el pH y esta relación lineal se obtiene comparando el potencial medido con el pH de diferentes tampones, el pH de la muestra se determina por interpolación.

La a_w nos proporciona información sobre el estado en el que se encuentra el agua en el producto (libre o ligada) y su disponibilidad para ser utilizada por los microorganismos, informando por tanto de la estabilidad microbiológica de los alimentos.

Muchos de los métodos más antiguos de conservación están basados en la desecación o deshidratación (eliminación de agua) y en la salazón (aumento de la osmolaridad), en ambos procesos se disminuye la actividad de agua.

- A valores de $a_w \geq 0,95$ casi todos los microorganismos se desarrollan bien. En estas condiciones predominan las bacterias, sobre todo los bacilos Gram negativos, ya que, por lo general, crecen con mayor rapidez que las bacterias Gram positivas y las levaduras, y con mucha mayor rapidez que los mohos. Dentro de este grupo se encuadran varios de los microorganismos patógenos con importancia en el Chorizo Asturiano (*E. coli* y *Salmonella* spp.).
- A valores de a_w inferiores a 0,95 hasta 0,85 juegan un papel importante los cocos Gram positivos y los lactobacilos, grupos microbianos con una mayor osmotolerancia.

El valor de a_w puede ser una referencia para determinar el grado de secado del Chorizo Asturiano. La a_w se determinó con un equipo Novasina Thermoconstanter TH-500 a 25 °C.

3.2.2 Determinación del contenido de sodio

La determinación del contenido de sodio ha sido realizada por fotometría de llama (emisión atómica).

3.2.3 Determinación de la humedad

La determinación del contenido de humedad de los alimentos es una de los parámetros más ampliamente usados en el control de los alimentos ya que indica la cantidad de agua involucrada en la composición de los mismos.

El análisis del porcentaje de humedad se realiza por la determinación de la pérdida de masa que sufre un alimento cuando se somete a una combinación tiempo/temperatura adecuada. El residuo que se obtiene se conoce como sólidos totales o extracto seco.

La determinación de la humedad fue desarrollada bajo las especificaciones descritas en el PNT-FQ-004 por gravimetría.

3.2.4 Determinación de cenizas

Las cenizas constituyen la materia inorgánica que forma parte constituyente de los alimentos (sales minerales). Las cenizas son los minerales presentes en la carne y los productos cárnicos y se encuentran generalmente en forma de sales. Las principales son: sodio, potasio, calcio, magnesio, hierro y fósforo.

Las cenizas se obtienen al someter el alimento a un proceso de incineración, mediante el cual se destruye la materia orgánica. La determinación en seco es el método más común para cuantificar la totalidad de minerales en alimentos y se basa en la descomposición de la materia orgánica quedando solamente materia inorgánica en la muestra. En el método empleado toda la materia orgánica se oxida y el material inorgánico que no se volatiliza a la temperatura de incineración ($550 \pm 5^{\circ}\text{C}$) se conoce como ceniza.

La determinación del contenido de cenizas fue desarrollada bajo las especificaciones descritas en el PNT-FQ-002 por gravimetría.

3.2.5 Determinación de proteína

El método empleado para la determinación del porcentaje de proteína total es el método Kjeldahl. En esta técnica se digieren las proteínas y otros componentes orgánicos de los alimentos en una mezcla con ácido sulfúrico en presencia de catalizadores, destruyendo la materia orgánica y formándose sulfato de amonio. El método se basa en la determinación del nitrógeno orgánico, donde el sulfato de amonio en exceso de hidróxido sódico libera amoníaco. Éste se destila recogiendo

sobre ácido bórico y formándose así borato de amonio, valorado posteriormente con ácido clorhídrico.

La determinación de la proteína fue desarrollada bajo las especificaciones descritas en el PNT-FQ-001 mediante destilación Buchi.

3.2.5 Determinación de grasa

El método se basa en la determinación del porcentaje de grasa total o grasa bruta a partir de una muestra sometida a hidrólisis ácida. Dicha muestra es sometida a un proceso de extracción continua (Soxhlet) utilizando como extractante mezclas de disolventes orgánicos, en concreto éter etílico y éter de petróleo. Tras esto se procede a la eliminación del disolvente, desecación del residuo y posterior determinación gravimétrica una vez alcance temperatura ambiente.

La determinación de la grasa fue desarrollada bajo las especificaciones descritas en el PNT-FQ-003.

3.3 Análisis microbiológicos

El procesado de las muestras para la realización de los análisis microbiológicos, se realiza en base a las directrices definidas en la norma ISO 6887-1, "Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico" y la norma ISO 6887-2, "Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico, parte 2, reglas específicas para la preparación de carnes y productos cárnicos". [8]

Para preparar la dilución inicial de las muestras, se pesa en el diluidor automático, la cantidad de muestra necesaria, según el parámetro que vaya a ser analizado (por ejemplo $10\text{ g} \pm 0,1\text{ g}$ ó $25\text{ g} \pm 0,25\text{ g}$), de manera aséptica, en bolsas de pesada de muestra estériles. Una vez tenemos pesada la muestra, al bajar el brazo dosificador, el diluidor dispensará la cantidad de agua de peptona tamponada necesaria para conseguir una dilución madre 1:10 (X g ó X mL de muestra de ensayo + 9X de agua de peptona tamponada).

Las diluciones decimales seriadas son suspensiones o diluciones obtenidas al mezclar un volumen determinado nueve veces superior de disolvente y repitiendo esta operación con diluciones sucesivas, hasta llegar a un nivel de dilución adecuado para el recuento.

A un tubo que contenga $9 \text{ mL} \pm 0,18 \text{ mL}$ de agua de peptona tamponada, se transfiere con una pipeta $1 \text{ mL} \pm 10 \text{ }\mu\text{L}$ de la dilución madre. Posteriormente se mezcla en el vórtex y se obtiene así la dilución 1:100. Esta operación es repetida sucesivamente para obtener las diluciones deseadas para las siembras (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , etc.) que se emplearán para realizar las determinaciones con un número de microorganismos en placa adecuados para el recuento.

En el caso de que los resultados sean cuantitativos, el resultado final se expresará como ufc por g de muestra analizada.

En general, para obtener el resultado de los recuentos de microorganismos en medio sólido, se utiliza la media ponderada del resultado obtenido en dos diluciones consecutivas.

La expresión utilizada es: $N = \Sigma C / 1,1 \times d$ siendo:

N: nº de microorganismos por g.

ΣC : sumatorio de las colonias contadas en todas las placas retenidas de dos diluciones sucesivas.

d: nivel de dilución correspondiente a la primera dilución retenida.

3.3.1 Determinación de microbiota patógena

Se determinaron los patógenos microbianos más habituales en el producto que nos ocupa, Chorizo Asturiano y atendiendo a lo definido en la legislación aplicable, Reglamento CE 2073/2005. **[13]**

Se realiza un triplicado para la determinación de patógenos, de cada una de las muestras incluidas en el estudio.

Los límites establecidos en base a los criterios microbiológicos para cada uno de los parámetros determinados son:

- *E. coli* β -glucuronidasa +: 5×10^2 ufc/g
- *Salmonella* spp.: Ausencia en 25 g
- *Listeria monocytogenes*: <100 ufc/g

Determinación de *E. coli* β -glucuronidasa +

Para la determinación de *E. coli* β -glucuronidasa +, se sigue la metodología descrita en la norma ISO 1649. [6]

E. coli β -glucuronidasa +, son bacterias que a 44 °C forman colonias características en el agar con Tergitol, adicionado con un sustrato cromogénico que revele la presencia de β -glucuronidasa cuando el ensayo se realiza según el siguiente método:

- A partir de la serie de diluciones decimales, se depositaron con una pipeta estéril, 1 mL de cada dilución en una placa Petri.
- Posteriormente se añadieron a cada placa unos 15 mL de Agar TBX, esterilizado y atemperado a unos 47 ± 2 °C.
- Tras mezclar perfectamente medio e inóculo sobre la mesa de trabajo, se dejó gelificar el agar y las placas se introdujeron en la estufa.
- La incubación fue a 44 ± 1 °C, durante 24 horas.
- Transcurrido el tiempo de incubación, se cuentan las colonias en aquellas placas que muestren entre 10 y 150 colonias aisladas y características de *E. coli* β -glucuronidasa +, colonias de 0,5 a 2 mm de diámetro y coloración verde.
- La media de colonias contadas, multiplicadas por el opuesto del factor de dilución de la placa elegida, da como resultado el recuento total de bacterias por g de muestra analizada.

Determinación de *Salmonella* spp.

Para la determinación de *Salmonella* spp. se sigue la metodología descrita en la norma ISO 6579:2002. [7]

El ensayo para la determinación de *Salmonella* spp. se realiza en varias etapas sucesivas, etapa de pre-enriquecimiento, etapa de enriquecimiento, aislamiento y en caso de encontrar colonias sospechosas, identificación.

Pre-enriquecimiento

- Se prepara la dilución madre 1:10 que será incubada a 37 ± 1 °C, durante 18-24 horas.

Enriquecimiento

- Tras la incubación, se sembró 1 mL de dilución madre en 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) y 1mL de la dilución madre en 10 mL de caldo Muller-Kauffman Tetrionato (MKTTn).
- El tubo de MKTTn fue incubado a 37 ± 1 °C, durante 18-24 horas y el tubo de RV fue incubado a $41,5 \pm 1$ °C durante 18-24 horas.

Aislamiento

- A partir del caldo RV, se siembra en superficie y por agotamiento agar Hektoen (HK) y agar xilosa lisina desoxicolato (XLD).
- A partir del caldo MKTTn, se siembra en superficie y por agotamiento agar Hektoen (HK) y agar xilosa lisina desoxicolato (XLD).
- Las placas fueron incubadas a 37 ± 1 °C, durante 18-24 horas.

Tras la incubación de las placas se procede a la lectura de las mismas.

Las colonias sospechosas de *Salmonella* spp. crecen en HK como colonias azul-verdosas. Habitualmente aparecen con centros negros, aquellas cepas SH₂ positivas.

Las colonias sospechosas de *Salmonella* spp. sobre agar XLD son rojas, debido a un cambio de pH por fermentación de la xilosa y descarboxilación de la lisina. Los centros de las mismas son negros, debido a la producción de SH₂. A veces no se forman centros negros o, por el contrario, las colonias son negras casi por completo.

La ausencia de colonias típicas de *Salmonella* spp. se expresará como un resultado negativo (ausencia en 25 g).

Para confirmar las colonias sospechosas de *Salmonella* spp. se realizaron una serie de pruebas bioquímicas e inmunológicas a partir de cultivos puros en agar nutritivo: tinción Gram, prueba de la oxidasa, API 20 E, aglutinación en látex y siembra en medio Triple Sugar Iron Agar.

Recuento de *Listeria monocytogenes*

El recuento de *Listeria monocytogenes* se realizó mediante un protocolo con validación AFNOR, en el que se emplea para el aislamiento un medio selectivo y diferencial, ALOA, que además en su formulación lleva incorporado un sustrato cromogénico. [15]

El ensayo para el recuento de *Listeria monocytogenes* consta de una etapa de revivificación en medio líquido y posterior siembra en medio sólido selectivo y diferencial.

Revivificación en medio líquido

- Se prepara la dilución madre 1:10 y se mantuvo durante 1 hora a una temperatura de $20 \pm 2^\circ \text{C}$ en el baño termostático.

Siembra en medio sólido y diferencial

- A partir de la dilución madre se siembra en superficie 1 mL en tres placas de ALOA de 90 mm de diámetro con el uso de una micropipeta. El inóculo se extiende mediante un asa de Digrafski estéril.
- Las placas así sembradas son incubadas durante 48 ± 2 horas a $37 \pm 1^\circ \text{C}$.

Los microorganismos sospechosos de ser *Listeria monocytogenes* forman colonias circulares, regulares, de 1 a 2 mm de diámetro, de color azul-verdoso y con un halo opaco alrededor.

La ausencia de colonias típicas de *Listeria monocytogenes* se expresará como <10 ufc/g.

Para confirmar las colonias sospechosas de *Listeria monocytogenes* se realizaron una serie de pruebas a partir de cultivos puros en agar TSYEA a partir de los cuales se procedió a realizar las pruebas de identificación descritas en la norma ISO: tinción Gram, prueba de la catalasa, API Listeria, test CAMP.

Para el recuento se seleccionaron placas con colonias sospechosas de *Listeria monocytogenes* y se realizaron las correspondientes pruebas de confirmación. El número de colonias confirmadas que cumplan los criterios de identificación se denominaron “a” y se realizaron los cálculos según la siguiente fórmula: $a = (b/A) \times C$, siendo:

a: nº de colonias confirmadas como *Listeria monocytogenes*

A: nº de colonias seleccionadas para la confirmación (5 colonias en general).

b: nº de colonias que cumplen los criterios de confirmación.

C. nº total de colonias consideradas como presuntas positivas en las placas seleccionadas según el criterio establecido de lectura.

El resultado indicará el número total de colonias, teniendo en cuenta las confirmaciones realizadas. El ensayo es cualitativo, por tanto los resultados se expresarán como número de unidades formadoras de colonias de *Listeria monocytogenes*, por gramo de muestra analizada.

3.3.2 Determinación de microbiota beneficiosa

Los métodos de microbiología clásica que fueron empleados para la determinación de los microorganismos de interés, están basados en medios de cultivo específicos para aislar y enumerar las células bacterianas viables.

Estos métodos son sensibles y proporcionan información cualitativa y cuantitativa.

Para iniciar el estudio microbiológico del Chorizo Asturiano, fue necesaria la preparación de soluciones madre que sirvieron de punto de partida para las diferentes determinaciones.

Determinación de bacterias ácido lácticas (BAL)

Son microorganismos que producen ácido láctico como producto metabólico final de la fermentación de carbohidratos. Así, estos microorganismos influyen en el proceso de acidificación de los productos fermentados, imprescindible para otorgarle al embutido sus características propias (textura, sabor y aroma) e impedir el desarrollo de bacterias alterantes y/o patógenas.

Para la determinación y recuento de las BAL, a partir de la dilución madre se realizó un banco de diluciones decimales seriadas. Posteriormente se realizó la siembra en superficie de 1 μ L de las diluciones adecuadas para los recuentos y para un buen aislamiento de los microorganismos, mediante asa de Digrafski, sobre placas preparadas de agar Man, Rogosa, Sharpe (MRS). Las placas así sembradas, fueron incubadas a 30 ± 1 °C y durante 72 ± 2 horas en condiciones de anaerobiosis. [10]

Determinación de Cocos Gram + Catalasa + (CGC+)

El desarrollo de este tipo de microbiota puede tener una influencia determinante en el flavor de los embutidos crudo-curados fermentados.

Las características organolépticas de los embutidos fermentados están originadas por la actividad enzimática de los grupos bacterianos anteriormente mencionados.

Tras los análisis microbiológicos se llevó a cabo un recuento para determinar el número de unidades formadoras de colonias por gramo de embutido (ufc/g).

En el estudio se trató de incluir aquellos microorganismos más numerosos, que pudieran influir de forma positiva en el desarrollo de las características organolépticas del producto y que además están presentes en las diferentes de muestras para alcanzar el criterio de homogenización del Chorizo Asturiano.

Para la determinación y recuento de los CGC+, a partir de la dilución madre se realizó un banco de diluciones decimales seriadas. Posteriormente se realizó la siembra en superficie de 1 μ L de las diluciones adecuadas para los recuentos y para un buen aislamiento de los microorganismos, mediante asa de Digrafski sobre placas preparadas de agar Sal Manitol. Las placas así sembradas, fueron incubadas a 30 ± 1 °C y durante 72 ± 2 horas. [5]

3.4 Aislamiento, conservación y caracterización de cepas aisladas

3.4.1 Aislamiento de cepas de interés tecnológico

Las características organolépticas de los embutidos fermentados están originadas por la actividad enzimática de las BAL y los CGC+. Sin embargo estos últimos parecen tener un mayor efecto que las BAL en el desarrollo del flavor de los embutidos.

En la selección de cultivos iniciadores no sólo deberían tenerse en cuenta propiedades tecnológicas, sino que también deben considerarse aspectos higiénico-sanitarios y de calidad.

Del conjunto de bacterias obtenidas mediante las técnicas clásicas de cultivo microbiológico, se llevó a cabo un aislamiento para la obtención de un cultivo puro y su posterior estudio y caracterización. Se seleccionaron por cada producto y grupo microbiano (bien BAL ó CGC+) un total de 5 colonias escogidas, teniendo en cuenta la morfología más numerosa y el azar, para cada una de las muestras.

En el caso de las BAL los cultivos puros aislados se realizaron en agar MRS y en el caso de los CGC+ en caldo de triptona y soja (TSB).

3.4.2 Conservación de cepas de interés tecnológico

Los aislados de interés fueron conservados mediante crio-conservación para posteriormente ser caracterizados y evaluar su posible potencial como cultivos iniciadores.

Para su identificación, conservación y trazabilidad se estableció un código interno de identificación de muestras:

- **XX-YYY-BAL**, para las BAL donde XX es el número de colonia identificada en la placa; YYY, código interno de la muestra en el laboratorio y BAL, como identificación de grupo bacteriano de bacterias ácido lácticas.
- **XX-YYY-CGC+**, en el caso de cocos Gram + Catalasa + donde XX es el número de colonia identificada en la placa; YYY, código interno de la muestra en el laboratorio y CGC+, como identificación de grupo bacteriano de cocos Gram + Catalasa +.

Se elaboró un cepario para el mantenimiento de los microorganismos de interés en congelación a -18 ± 2 °C.

Para la conservación de las cepas se usan crioviales con MRS+15% glicerol para BAL y TSB+15% de glicerol en el caso de CGC+. El glicerol es añadido al caldo de cultivo de conservación como agente criopreservador. [3]

A partir del cultivo puro las cepas se conservan congeladas en un número suficiente de viales para que al preparar la cepa de trabajo se use un sólo criovial, que posteriormente es eliminado en el autoclave, evitando así contaminaciones de los viales conservados o posibles modificaciones génicas de los aislados consecuencia de procesos sucesivos de congelación/descongelación.

Los viales se prepararon de la siguiente forma:

1.- Se preparó una suspensión turbia de un cultivo puro de la cepa en medio MRS+ 15% glicerol ó TSB+15% glicerol, correspondiente a un valor de absorbancia de 0.5 a una longitud de onda de 550 nm. La concentración estimada de las suspensiones bacterianas preparadas para la crio-conservación se sitúa en torno a 10^8 ufc/mL.

2.- Se repartió la suspensión bacteriana en los crioviales a razón de 1 mL por criovial.

3.- Los crioviales se cerraron y se identificaron con el código de la cepa y fecha de preparación.

4.- Los crioviales se almacenaron manteniéndolos en vertical en el congelador a -18 ± 2 °C.

Las cepas así conservadas pueden mantenerse, si no sufren descongelaciones, durante años.

3.4.3 Caracterización de los aislados

A partir de los cultivos puros aislados tanto de BAL, como de CGC+ se emplearon diferentes técnicas de identificación para su caracterización.

En todos los caso se hizo una observación microscópica mediante tinción Gram de los microorganismos aislados para una primera caracterización y comprobar así que la morfología se correspondía con el grupo bacteriano.

En cuanto a las pruebas de identificación bioquímica, se siguieron protocolos de identificación diferente en función de si se trataba de BAL o bien de CGC+.

Caracterización de bacterias ácido lácticas

Para la identificación de las BAL se emplearon un total de 50 ensayos bioquímicos destinados fundamentalmente al estudio del metabolismo de los hidratos de carbono en los microorganismos. Para ello se utilizaron galerías de identificación API 50 CH, combinadas con el uso de API 50 CH Medium. Se preparó una suspensión bacteriana de cada uno de los microorganismos de BAL en estudio y a partir de cultivos de trabajo sobre el medio API 50 CH. Posteriormente se inoculan los diferentes microtubos donde se lleva a cabo el estudio de la fermentación de los diferentes sustratos. [1]

Cada microtubo lleva un sustrato perteneciente a la familia de los hidratos de carbono y carbohidratos (heterósidos, polialcoholes, ácidos urónicos). Una vez inoculados y si hay fermentación, esto se traduce en un cambio de color en el microtubo, debido a la producción de ácido en anaerobiosis, revelada por el indicador de pH del medio elegido. Además se incubó un microtubo, sin principio activo, que sirve como testigo.

La oxidación se traduce por un cambio de color en la cúpula, debido a la producción de ácido en anaerobiosis revelada por un indicador de pH.

La asimilación se traduce por un crecimiento del microorganismo en la cúpula cuando el sustrato se utiliza como única fuente de carbono presente.

Las pruebas en base a las cuales se hizo la identificación de las bacterias ácido lácticas son las siguientes:

Componente activo	Cantidad (mg)	Componente activo	Cantidad (mg)
Testigo	-	Esculina/citrato férrico	1,16 / 0,152
Glicerol	1,64	Salicina	1,04
Eritritol	1,44	D-Celobiosa	1,32
D-Arabinosa	1,4	D-Maltosa	1,4
L-Arabinosa	1,4	D-Lactosa	1,4
D-Ribosa	1,4	D-Melibiosa	1,32
D-Xilosa	1,4	D-Sacarosa	1,32
L-Xilosa	1,4	D-Trehalosa	1,32
D-Adonitol	1,6	Inulina	1,28
Metil- β D-Xilopiranosida	1,28	D-Melezitosa	1,32

D-Galactosa	1,4	D-Rafinosa	1,56
D-Glucosa	1,56	Almidón	1,28
D-Fructosa	1,4	Glicógeno	1,28
D-Mamnosa	1,4	Xilitol	1,4
L-Sorbosa	1,4	Gentiobiosa	0,5
L-Rhamnosa	1,36	D-Turanosa	1,32
Dulcitol	1,36	D-Lixosa	1,4
Inositol	1,4	D-Tagatosa	1,4
D-Manitol	1,36	D-Fucosa	1,28
D-Sorbitol	1,36	L-Fucosa	1,28
Metil- α D- Manopiranosida	1,28	D-Arabitól	1,4
Metil- α D- Glucopiranosida	1,28	L-Arabitól	1,4
N-AcetilGlucosamina	1,28	Gluconato potásico	1,84
Amigdalina	1,08	2-Cetocluconato potásico	2,12
Arbutina	1,08	5-Cetocluconato potásico	1,8

Tabla 1. Pruebas bioquímicas empleadas para la identificación de BAL.

Caracterización de CGC+

La identificación bioquímica de las cepas seleccionadas como cocos Gram + Catalasa + se realizó mediante el sistema API STAPH que permite la identificación de especies de *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Kocuria* a partir de pruebas bioquímicas estandarizadas y miniaturizadas. [2]

La identificación se basa en la capacidad de las cepas para hidrolizar o no los compuestos que contienen las diferentes pruebas de la galería.

Las pruebas en base a las cuales se hizo la identificación de los CGC+ fueron las siguientes:

Componente activo	Cantidad (mg)	Reacción / Enzimas
Sin sustrato	-	Testigo negativo
D-glucosa	1,56	Testigo positivo

D-fructosa	1,4	Acidificación
D-manosa	1,4	Acidificación
D-maltosa	1,4	Acidificación
D-lactosa	1,4	Acidificación
D-trehalosa	1,32	Acidificación
D-manitol	1,36	Acidificación
Xilitol	1,4	Acidificación
D-melibiosa	1,32	Acidificación
Nitrato de potasio	0,08	Reducción nitratos a nitritos
β -nafti fosfato	0,0244	Fosfatasa alcalina
Piruvato de sodio	1,904	Producción de acetil-metil-carbinol
D-rafinosa	1,56	Acidificación
D-xilosa	1,4	Acidificación
D-sacarosa	1,32	Acidificación
Metil- α D-glucopiranosida	1,28	Acidificación
N-acetil-glucosamina	1,28	Acidificación
L-arginina	1,904	Arginina dihidrolasa
Urea	0,76	Ureasa

Tabla 2. Pruebas bioquímicas empleadas para la identificación de los CGC+.

3.5 Evaluación del potencial de los diferentes aislados como cultivos iniciadores

3.5.1 Determinación de requerimientos nutricionales

La fermentación tiene lugar por la acción de los microorganismos presentes en la masa cárnica, los cuales son capaces de metabolizar los azúcares presentes y transformarlos en ácido láctico. El descenso del pH puede ser más o menos pronunciado según los microorganismos presentes, condiciones extrínsecas de temperatura, humedad,... y de los azúcares presentes.

Los microorganismos pueden usar los azúcares presentes de forma natural en la masa, o bien ser éstos añadidos de forma deliberada para favorecer las reacciones de fermentación. La glucosa es rápidamente asimilada por la mayor parte de los microorganismos, pero también pueden ser utilizados lactosa, sacarosa u otros.

En esta tarea se evaluó la capacidad de los aislados en cuanto a su capacidad para fermentar azúcares, en concreto glucosa y lactosa, ya que ambos se introducen en

ocasiones de forma deliberada en la masa para favorecer las reacciones de fermentación. Para ejecutarla se analizaron los datos obtenidos de las reacciones fermentativas empleadas en las pruebas bioquímicas de identificación.

4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

4.1 Determinación de pH y a_w

Los resultados obtenidos en cuanto a pH y a_w se muestran a continuación.

A la vista de los mismos se comprueba que los valores de pH obtenidos favorecen la proliferación de BAL, inhibiendo crecimiento del resto de microbiota acompañante (banal, alterante y/o patógena). Los valores de a_w en todos los casos son inferiores a 0,95, lo que favorece la proliferación de microbiota Gram positiva (BAL y CGC+) con posible interés tecnológico, frente a microbiota Gram negativa, dentro de la que se pueden encuadrar muchos de los grupos bacterianos alterantes y/o patógenos del Chorizo Asturiano.

Para cada una de las muestras incluidas en el estudio se analizaron tres réplicas (n=3).

Muestra	Media valores pH	Media valores a_w
1	5,2	0,83
2	5,6	0,86
3	5,3	0,84
4	5,1	0,84
5	5,0	0,86
6	5,2	0,89
7	5,4	0,88
8	5,2	0,87
9	5,5	0,83
10	5,6	0,87
11	5,7	0,81
12	5,1	0,86
13	4,9	0,77
14	5,5	0,72
15	5,5	0,77
Promedio	5,3	0,84

Tabla 3. Media de los valores de pH y a_w obtenidos en las muestras.

Teniendo en cuenta los resultados de pH y a_w obtenidos, se puede decir que el Chorizo Asturiano es un producto microbiológicamente estable, siempre y cuando las piezas se mantengan correctamente envasadas (lo recomendable es un envase al vacío para evitar fundamentalmente la proliferación de mohos en superficie), perfectamente íntegras y en condiciones de conservación adecuadas.

Además atendiendo a los resultados obtenidos de a_w , en todos los casos con valores ≤ 0.92 y en base a la legislación vigente de criterios microbiológicos, se puede considerar que el Chorizo Asturiano puede ser encuadrado como alimento listo para el consumo que no puede favorecer el desarrollo de *Listeria monocytogenes*, y por tanto aplicable como criterio el límite de 100 ufc/g (frente al criterio más restrictivo de Ausencia en 25 g para aquellos alimentos listos para el consumo que puedan favorecer el desarrollo de *Listeria monocytogenes*).

4.2 Determinación del contenido de Na.

En la tabla a continuación se muestran los contenidos en Na obtenidos en las diferentes muestras. Se analizaron tres réplicas (n=3).

Muestra	Media Na g/ Kg
1	9,74
2	13,09
3	12,23
4	11,25
5	11,30
6	10,92
7	11,75
8	12,13
9	12,93
10	8,65
11	16,65
12	10,53
13	11,74
14	10,73
15	11,71

Promedio	11,69
-----------------	--------------

Tabla 4. Media de los valores de Na obtenidos en las muestras.

La sal juega un papel importante en los productos cárnicos tanto por su acción conservante y estimulante del sabor, como por sus propiedades tecnológicas. El cloruro de sodio permite la solubilización y extracción de las proteínas miofibrilares favoreciendo la ligazón y la textura característica de los embutidos crudo-curados.

Por otro lado juega un efecto sinérgico en la estabilidad y seguridad microbiana, basada en la combinación de varios factores estableciendo lo que se conoce como “efecto barrera”.

El contenido de sal determinado en las diferentes muestras, así como el proceso de secado y maduración al que el producto es sometido, favorecen una a_w baja, contribuyendo de esta forma a la obtención de un producto microbiológicamente estable como ya se ha señalado anteriormente, hecho que dificulta la proliferación de microbiota patógena y/o alterante.

4.3. Determinación del perfil nutricional

Muestra	Humedad %	Cenizas %	Proteínas %	Grasa %
1	37,37	3,91	19,93	36,87
2	32,22	4,37	20,00	42,37
3	39,30	4,11	19,33	34,28
4	25,22	4,34	21,88	44,05
5	37,76	3,70	20,65	32,25
6	34,04	3,58	21,46	37,95
7	44,58	3,21	23,45	28,06
8	41,71	3,57	18,76	34,02
9	30,29	4,12	22,51	39,44
10	36,20	3,62	19,52	38,17
11	30,79	4,30	28,56	31,85
12	35,47	3,35	21,45	32,54
13	36,81	4,13	14,96	39,21
14	34,37	4,56	23,15	34,17

15	37,70	4,92	25,19	33,56
Promedio	35,93	3,96	21,39	36,21

Tabla 5. Media de los valores del contenido en macro-nutrientes.

Para cada una de las muestras incluidas en el estudio se analizaron tres réplicas.

Se determinó el contenido en nutrientes porque éstos son necesarios para la correcta proliferación de los microorganismos.

4.4 Determinación de microbiota patógena.

Se comprueba que en ninguno de los casos las muestras superan el criterio microbiológico marcado como límite para cada uno de los patógenos analizados.

Muestra	<i>E. coli</i> β -glucuronidasa +	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria monocytogenes</i>
1	<10	Ausencia	<10
2	<10	Ausencia	<10
3	$1,2 \times 10^2$	Ausencia	<10
4	$3,0 \times 10^1$	Ausencia	<10
5	$7,0 \times 10^1$	Ausencia	$7,0 \times 10^1$
6	$1,2 \times 10^2$	Ausencia	$5,0 \times 10^1$
7	<10	Ausencia	<10
8	<10	Ausencia	<10
9	<10	Ausencia	<10
10	<10	Ausencia	<10
11	<10	Ausencia	<10
12	<10	Ausencia	<10
13	<10	Ausencia	<10
14	<10	Ausencia	<10
15	<10	Ausencia	<10

Tabla 6. Resultados obtenidos del análisis de patógenos.

En el caso de *E. coli* β -glucuronidasa +, el límite superior definido es de 500 ufc/g ($5,0 \times 10^2$ ufc/g), que en ninguno de los casos es superado.

En ninguna de las muestras analizadas se detecta la presencia de *Salmonella* en los 25 g de muestra analizada, corroborando el efecto barrera que sobre los patógenos ejercen las características intrínsecas del Chorizo Asturiano como pH, a_w , contenido en

Na, etc. así como el efecto competidor que podrían ejercer las BAL presentes en la masa y responsable de los procesos fermentativos.

En dos de las muestras analizadas se detectó *Listeria monocytogenes*, pero en ninguno de los casos el recuento supera las 100 ufc/g establecidas en el reglamento de criterios microbiológicos para productos con los valores de a_w propios del Chorizo Asturiano.

4.5 Determinación de microbiota beneficiosa

A continuación se muestran los resultados obtenidos de los diferentes grupos bacterianos analizados.

Muestra	Bacterias ácido lácticas	Cocos Gram + Catalasa +
1	$9,8 \times 10^6$	$< 10^3$
2	$6,4 \times 10^6$	$< 10^3$
3	$4,8 \times 10^6$	$< 10^3$
4	$3,7 \times 10^6$	$< 10^3$
5	$1,1 \times 10^7$	$< 10^3$
6	$2,0 \times 10^7$	$4,2 \times 10^3$
7	$1,5 \times 10^7$	$4,0 \times 10^3$
8	$3,9 \times 10^7$	$4,0 \times 10^3$
9	$7,3 \times 10^6$	$1,0 \times 10^3$
10	$2,2 \times 10^7$	$5,0 \times 10^3$
11	$8,8 \times 10^7$	$3,4 \times 10^3$
12	$7,1 \times 10^7$	$1,3 \times 10^4$
13	$7,3 \times 10^7$	$< 10^3$
14	$4,3 \times 10^7$	$1,8 \times 10^3$
15	$8,3 \times 10^7$	$4,0 \times 10^3$

Tabla 7. Resultados obtenidos del recuento de BAL y CGC+.

Analizando los resultados se comprueba que la carga bacteriana de BAL oscila entre 6 log ufc/g y 7 log de ufc/g, estableciéndose las BAL como grupo microbiano mayoritario y responsable de la fermentación del producto.

Los niveles encontrados entre 6-7 log ufc/g son los adecuados para que se lleven a cabo los procesos fermentativos en los embutidos crudo-curados.

La concentración de CGC+ es como mínimo 3 órdenes de magnitud inferior a la concentración de BAL, en muchos casos inferior al límite de detección (10^3 ufc/g) definido en a las diluciones empleadas en la determinación. La concentración en el producto final no justifica claramente algún tipo de función tecnológica en el producto. No obstante en las siguientes etapas del proyecto se continuó con su caracterización.

4.6 Caracterización de BAL

Los resultados de identificación de los microorganismos para cada una de las muestras se reflejan a continuación:

Muestra	Bacterias ácido lácticas
1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> / <i>dextranicum</i>
	<i>Lactococcus lactis</i>
2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> / <i>dextranicum</i>
	<i>Lactobacillus fermentum</i>
	<i>Lactobacillus plantarum</i>
3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> / <i>dextranicum</i>
	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>
	<i>Lactobacillus fermentum</i>
4	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ó <i>Lactobacillus curvatus</i>
	<i>Lactobacillus fermentum</i>
5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> / <i>dextranicum</i>
	<i>Lactobacillus plantarum</i>
6	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
7	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
	<i>Lactococcus lactis</i>
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
8	<i>Lactococcus lactis</i>
9	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

	<i>Lactococcus lactis</i>
10	<i>Lactobacillus lactis</i>
11	<i>Lactococcus lactis</i>
	<i>Lactobacillus brevis</i>
12	<i>Lactobacillus pentosus</i>
	<i>Lactobacillus brevis</i>
13	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
	<i>Lactobacillus plantarum</i>
14	<i>Lactococcus lactis</i>
	<i>Lactobacillus brevis</i>
15	<i>Lactococcus lactis</i>
	<i>Lactobacillus fermentum</i>
	<i>Lactobacillus brevis</i>

Tabla 8. Microorganismos identificados tras las pruebas de identificación bioquímica dentro del grupo de BAL.

4.7 Caracterización de CGC+

En 10 de las 15 muestras analizadas, o bien los microorganismos pertenecientes al grupo de Cocos Gram + Catalasa + se encontraban por debajo del límite de detección determinado por las diluciones de análisis (límite de detección de 10^3 ufc/g) y cuando se obtuvieron aislados, en la mayoría de los casos fue imposible realizar una identificación bioquímica aceptable.

Únicamente fue posible la identificación en 8 aislados.

Los resultados de identificación de los Cocos Gram + Catalasa + se muestran en la tabla a continuación:

Muestra	Cocos Gram + Catalasa +
1	-
2	-
3	-
4	-
5	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>

6	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
	<i>Kocuria varians</i>
7	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
	<i>Kocuria varians</i>
8	<i>Kocuria varians</i>
9	<i>Staphylococcus sp.</i>
	<i>Kocuria varians</i>
10	-
11	-
12	-
13	-
14	-
15	-

Tabla 9. Microorganismos identificados tras las pruebas de identificación bioquímica dentro del grupo de los CGC+.

4.8 Determinación de requerimientos nutricionales

La determinación de los requerimientos nutricionales se estableció en base a la capacidad de fermentación de dos azúcares, la glucosa y la lactosa y mediante la recuperación de los datos obtenidos en las pruebas bioquímicas de identificación.

En el caso de las BAL se comprueba que como cabía esperar, todos los aislados son capaces de fermentar la glucosa. En el caso de la lactosa y si atendemos a este criterio para la posible selección de microorganismos en el desarrollo futuro de cultivos iniciadores específicos del Chorizo Asturiano se comprueba que muchas de las cepas aisladas no son capaces de fermentar este azúcar.

Muestra	Bacterias ácido lácticas	Glucosa	Lactosa
1	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides / dextranicum</i>	+	-
	<i>Lactococcus lactis</i>	+	+
2	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides / dextranicum</i>	+	-
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	+	?

	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	?
3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> / <i>dextranicum</i>	+	-
	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>	+	-
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	+	-
4	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ó <i>Lactobacillus curvatus</i>	+	+
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	+	-
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+	+
5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> / <i>dextranicum</i>	+	-
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+
6	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	-
7	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	-
	<i>Lactococcus lactis</i>	+	-
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	+	-
8	<i>Lactococcus lactis</i>	+	-
9	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	-
	<i>Lactococcus lactis</i>	+	-
10	<i>Lactobacillus lactis</i>	+	-
11	<i>Lactococcus lactis</i>	+	?
	<i>Lactobacillus brevis</i>	+	-
12	<i>Lactobacillus pentosus</i>	+	+
	<i>Lactobacillus brevis</i>	+	-
13	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	-
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+
14	<i>Lactococcus lactis</i>	+	-
	<i>Lactobacillus brevis</i>	+	+
15	<i>Lactococcus lactis</i>	+	-
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	+	-
	<i>Lactobacillus brevis</i>	+	-

+: Fermentación azúcar positiva / -: Fermentación azúcar negativa.

Tabla 10. Requerimientos nutricionales de las BAL identificadas.

Para la determinación de los requerimientos nutricionales de los CGC+ se estableció el mismo esquema de trabajo que en el caso de las BAL. Algunos de los aislados no fermentan la glucosa y únicamente dos cepas aisladas, correspondientes a la especie *Staphylococcus saprophyticus* son capaces de fermentar la lactosa.

Esto parece reafirmar el hecho de que las cepas de CGC+ aisladas no presentan unas características tecnológicas adecuadas para el futuro desarrollo de cultivos iniciadores específicos del Chorizo Asturiano.

Muestra	Cocos Gram + Catalasa +	Glucosa	Lactosa
5	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	+	+
6	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	+	+
	<i>Kocuria varians</i>	-	-
7	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	+	-
	<i>Kocuria varians</i>	-	-
8	<i>Kocuria varians</i>	-	-
9	<i>Staphylococcus sp.</i>	+	-
	<i>Kocuria varians</i>	+	-

+: Fermentación azúcar positiva. / -: Fermentación azúcar negativa.

Tabla 11. Requerimientos nutricionales de los CGC+ identificadas.

5. CONCLUSIONES

El producto estudiado y caracterizado en este trabajo, el Chorizo Asturiano, es un producto de gran tradición en el Principado de Asturias, actualmente amparado bajo el desarrollo de una Marca Colectiva.

Este proyecto es una primera aproximación a la caracterización del Chorizo Asturiano, tanto a nivel sensorial y físico-químico, como microbiológico, para establecer las características estándar y contribuir a una mejora de su calidad y salubridad.

El Chorizo Asturiano es un producto tradicional, elaborado en la mayoría de los casos sin la adición de cultivos iniciadores, de manera que en el proceso de fermentación participan microorganismos aportados por la contaminación natural de la masa. Esta microbiota no sólo está constituida por microorganismos de interés tecnológico, si no que en ocasiones, pueden aparecer microorganismos relacionados con el deterioro o incluso patógenos.

En cuanto a la evaluación sensorial de las muestras para su posterior selección se observó que las mayores diferencias se establecían en función del grado de curación de los productos, que influía directamente en la percepción de los atributos flavor y olor, encontrándose también diferencias en el nivel de ahumado. La evaluación sensorial estableció las bases para determinar las muestras a incluir en la posterior caracterización físico-química y microbiológica.

Se analizaron un total de 15 lotes de Chorizo Asturiano, pertenecientes a otros tantos fabricantes.

Se comprueba que la estabilidad y seguridad del Chorizo Asturiano se basa en la combinación de varios factores (obstáculos) que no deberían ser vencidos por los microorganismos. Este llamado “efecto barrera” es el resultado de las complejas interacciones entre las características intrínsecas de pH, a_w , contenido en Na, etc... del Chorizo Asturiano con las que se logra alcanzar una estabilidad microbiana una vez finalizados los procesos fermentativos en el producto.

En el caso de la determinación de patógenos, se comprueba que en ninguno de los casos supera los límites marcados por la legislación en el Reglamento (CE) 2013/2005

relativo a los criterios microbiológicos aplicados a los productos alimenticios. En el reglamento se establece como criterio microbiológico Ausencia de *Salmonella* spp. en 25 g de matriz analizada y el límite de 100 ufc/g en el caso de recuento de *Listeria monocytogenes* para alimentos que no favorezcan el crecimiento del patógeno. El Chorizo Asturiano por sus características intrínsecas de pH y a_w no puede favorecer la proliferación de *Listeria* a lo largo de la vida útil del producto. En el caso de la determinación de *E. coli* β -glucuronidasa positiva en ningún caso se supera el límite de 5×10^2 establecido legislación que aunque derogada, se sigue usando como referencia. Además gracias a sus propiedades intrínsecas, es un producto donde se genera un ambiente desfavorable para la proliferación de microorganismos tales como *E. coli*, *Salmonella* o *Listeria monocytogenes*. El desarrollo futuro de cultivos iniciadores específicos podría ser un elemento favorecedor del cumplimiento de los criterios de seguridad alimentaria si se seleccionaran cepas capaces de inhibir *Listeria monocytogenes* y/o *Salmonella* y/o *E. coli*.

Las técnicas empleadas en la caracterización de los microorganismos presentes en el Chorizo Asturiano, tanto en el caso de identificación de BAL, como de CGC+, se han basado en procedimientos microbiológicos tradicionales (cultivo, aislamiento en placa, identificación bioquímica combinada o no con otras pruebas bioquímicas). Estas metodologías de identificación están respaldadas por muchos años de experiencia y además proporcionan una herramienta imprescindible para abordar la tipificación bacteriana, ya que permiten el aislamiento diferenciado de las cepas microbianas. En este caso los microorganismos han sido caracterizados a nivel de género y/o especie, llegando a la identificación de los mismos, pero no al nivel de tipificación de especie.

Las principales especies determinadas fueron *Lactococcus lactis* y *Leuconostoc mesenteroides* que constituyen casi un 58 % de la microbiota identificada. Las cepas de *Lactobacillus plantarum* constituyen un 13 % de los microorganismos identificados y *Lactobacillus fermentum* un 9 %.

En el caso de *Lactococcus lactis*, está presente en un 60 % de los fabricantes de Chorizo Asturiano y *Leuconostoc mesenteroides* en un 53%, que junto con cepas de

Lactobacillus plantarum y *Lactobacillus fermentum* constituyen la microbiota mayoritaria.

De las BAL mayoritariamente aisladas las que presentan unas mejores cualidades tecnológicas en cuanto a su capacidad de fermentación tanto de glucosa, como de lactosa están *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus plantarum*.

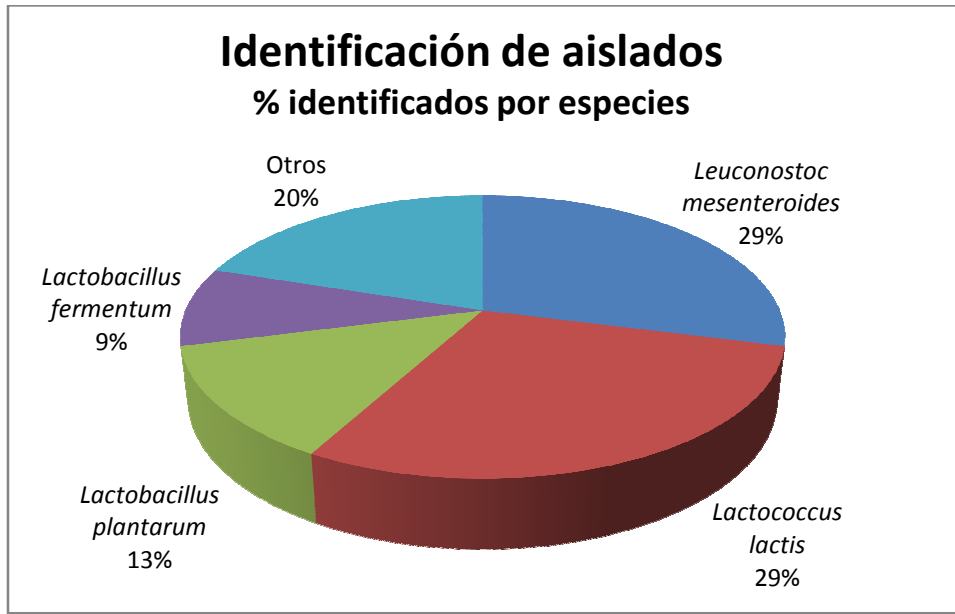


Figura 3. % de identificación por especies de los aislados pertenecientes al grupo de BAL

En cuanto a los CGC+ aislados en el Chorizo Asturiano no parecen tener una función tecnológica que se pueda definir claramente en el producto, ya que no está justificada ni por su concentración final en la matriz, ni por las propiedades tecnológicas evaluadas.

Con el estudio parece demostrado que existe una microbiota predominante y común a la mayor parte de los fabricantes dentro de la Marca Colectiva Chorizo Asturiano y sus características tecnológicas podrían permitir el desarrollo futuro de un cultivo iniciador específico.

Como se mencionó anteriormente, este estudio forma parte de un trabajo futuro, más ambicioso, en el que, en base a una tipificación de los microorganismos aislados y una

evaluación de sus características tecnológicas más exhaustiva, permita el desarrollo de uno o varios cultivos iniciadores específicos del Chorizo Asturiano.

Entre las acciones futuras previstas estaría una tipificación de los productos a nivel molecular, ya que estas técnicas permitirían superar las limitaciones de las técnicas de microbiología clásica tales como la baja sensibilidad, la no detección de microorganismos no cultivables, en ocasiones su escasa reproducibilidad y permitir su tipificación distinguiendo cepas o aislamientos pertenecientes a la misma especie, además de comprobar la trazabilidad de microorganismos.

Actualmente se considera que para el estudio de comunidades bacterianas en matrices alimentarias, es preferible emplear el uso combinado de técnicas clásicas de cultivo y técnicas moleculares, de manera que se obtenga una visión más aproximada de la ecología microbiana en los procesos fermentativos y de maduración.

Por otro lado se hace necesario un control más exhaustivo de la capacidad tecnológica de los aislados y su capacidad para su producción a nivel industrial. Para ello debería ser necesario como continuación del presente trabajo:

- Evaluación de la tasa de crecimiento. Los microorganismos a emplear como cultivos iniciadores deberían tener una tasa de crecimiento y o multiplicación elevada, para asegurar un nivel de producción industrial del cultivo/s iniciadores.
- Evaluación de los cultivos aislados para la mejora de la calidad higiénico-sanitaria, determinando su potencial para la posible inhibición y la capacidad antagonista que pudieran ejercer sobre los patógenos alimentarios más habituales en el Chorizo Asturiano.
- Evaluación de los cultivos aislados para la mejora y/homogenización de las características sensoriales, determinando su actividad lipolítica y proteolítica.

6. SÍMBOLOS

+	Reacción positiva
-	Reacción negativa
?	Reacción con resultado dudoso
μL	Microlitro
%	Porcentaje
a_w	Actividad de agua
BAL	Bacterias ácido lácticas
° C	Grados centígrados
CGC+	Cocos Gram-positivos catalasa-positivos
Log	Logaritmo decimal
g	Gramo
HK	Agar Hektoen
mg	Miligramo
MKTTn	Caldo Muller Kauffman Tetracionato
mL	Mililitro
MRS	Man, Rogosa, Sharpe
n	Número de unidades de muestra
Na	Sodio
nm	Nanómetro
RV	Caldo Rappaport Vasilliadis
TSB	Caldo de triptona y soja
TSYEA	Agar triptona soja y extracto de levadura
ufc	Unidad formadora de colonia

ufc/g Unidad formadora de colonia por gramo

XLD Agar xilosa, lisina, dexosicolato

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] bioMérieux, manual de uso de API 50 CH.
- [2] bioMérieux, manual de uso de API Staph.
- [3] CECT. Documentación del curso “Conservación y control de cepas microbianas”.
- [4] Gloria Díaz Ruiz, 2003. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados.
- [5] Martín Juárez Belén, 2005. Estudio de las comunidades microbianas de embutidos fermentados ligeramente acidificados mediante técnicas moleculares. Estandarización, seguridad y mejora tecnológica.
- [6] Norma UNE-EN ISO 1649-1:2001 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la enumeración de *E. coli* β -glucuronidasa positiva”.
- [7] Norma UNE-EN ISO 6579:2002 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.”
- [8] Norma UNE-EN ISO 6887-1 “Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico” e ISO 6887-2, “Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico, parte 2, reglas específicas para la preparación de carnes y productos cárnicos”.
- [9] Norma UNE-EN ISO 7218:2007. “Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Requisitos generales y guía para el examen microbiológico”.
- [10] Norma UNE-EN ISO 15214:1998 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la enumeración de bacterias ácido lácticas. Técnica de recuento de colonias a 30 °C”.
- [11] Norma UNE-EN ISO 17025:2005. “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración”.

[12] Orden de 7 de febrero de 1980 por la que se aprueba la norma de calidad para los productos cárnicos embutidos crudo-curados.

[13] Reglamento (CE) Nº 2073/2005, Relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios y su posterior modificación, Reglamento (CE) Nº 1441/2007).

[14] Reglamento de uso de la Marca Colectiva Chorizo Asturiano. ASINCAR, 2012.

[15] Validación AFNOR Protocolo 520080:01/04/2010, "Método para el recuento de *Listeria monocytogenes*", ISO 11290-1 e ISO 11290-2 "Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes*".

ANEXO I – FICHA DE CATA

Sesión:

Fecha:

Nombre:

Evaluaremos 6 muestras de chorizo asturiano. Analizar siguiendo este orden, de izquierda a derecha: **código-código-código-código-código-código**

Situar el código de cada muestra sobre la escala (de 1 a 5). Valorar por completo cada muestra antes de comenzar con la siguiente. La puntuación de cada muestra puede tener pequeñas correcciones a lo largo de la sesión de cata.

Antes de comenzar la cata, aclararse la boca con agua. Comenzar por una valoración visual del color (intensidad de color, de naranja a rojo oscuro). Después valorar el olor, con inspiraciones cortas, detectando la intensidad de los siguientes atributos: carne fresca-curada, pimentón, especias y ahumado.

Seguidamente, separar la piel, cortar la loncha por la mitad y masticar lentamente, valorando el flavor (sabor en boca y por vía retro-nasal), detectando la intensidad de atributos como ácido, carne fresca-curada, pimentón, especias y ahumado.

Masticar la segunda mitad y valorar la textura: cohesividad de la loncha (poco o muy compacta), curación (poco curado-muy curado), jugosidad (facilidad para soltar el agua durante la masticación y/o estimular la secreción salivar), untuosidad (sensación de grasa en la boca) y masticabilidad (número de masticaciones necesarias para poder deglutir la muestra).

Al finalizar, hacer una valoración general hedónica que recoja el conjunto de sensaciones y permita definir cuánto ha gustado la muestra.

EVALUACIÓN COLOR (visual):

INTENSIDAD DE COLOR

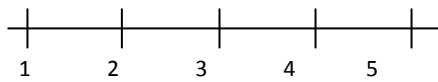


naranja

rojo oscuro

EVALUACIÓN OLOR:

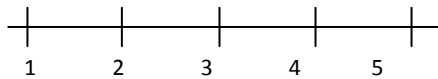
INTENSIDAD DE OLOR A CARNE FRESCA/CURADA:



carne fresca

carne curada

INTENSIDAD DE OLOR A PIMENTÓN:



suave

intenso

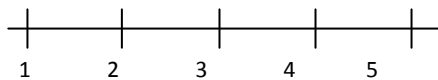
INTENSIDAD DE OLOR A ESPECIAS (AJO, ETC):



suave

intenso

INTENSIDAD DE OLOR A AHUMADO:



suave

intenso

EVALUACIÓN FLAVOR:

INTENSIDAD DE **SABOR A ÁCIDO**:



suave

intenso

INTENSIDAD DE **SABOR A CARNE FRESCA/CURADA**:



carne fresca

carne curada

INTENSIDAD DE **SABOR A PIMENTÓN**:



suave

intenso

INTENSIDAD DE **SABOR A ESPECIAS (AJO, ETC)**:



suave

intenso

INTENSIDAD DE **SABOR A AHUMADO**:



suave

intenso

