



EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL USO DE CULTIVOS INICIADORES EN LA ELABORACIÓN DE UN PRODUCTO CÁRNICO CRUDO CURADO A PARTIR DE PERNILES DE CORDERO

Estudiantes:

**LECI CAMILA ARIZA SALAS
PAOLA ANDREA NARANJO ROZO**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTA D.C**

2018



EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL USO DE CULTIVOS INICIADORES EN LA ELABORACIÓN DE UN PRODUCTO CÁRNICO CRUDO CURADO A PARTIR DE PERNILES DE CORDERO

Asesores:

SUSAN LORENA CASTRO

MSc. Microbiología

CAROLINA JAIME RODRIGUEZ

MSc. Desarrollo sustentable y Gestión ambiental

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

TRABAJO DE GRADO

BOGOTA D.C

2018

DEDICATORIA

A Dios sobre todas las cosas por darme la sabiduría y el entendimiento necesario para poder terminar este lindo proceso, mis padres Alfonso y Olga que son mi polo a tierra, por su fe ciega y mantenerme siempre en pie luchando constantemente conmigo, todos mis logros son por y para ellos, mis hermanos Edwin, Johana y Duvan que son cómplices y compañeros de vida, Valery mi eterna adoración, mi familia por su confianza y amor, finalmente a una parte esencial de este camino mis amigas a todas y cada una de ellas gracias por hacer de este viaje la mejor experiencia de mi vida

Paola N.R

A Dios por hacer posible cada bendición que llega a mi vida, por llenarme de sabiduría y tranquilidad para poder terminar con éxito este proceso, a mis padres Libardo por ser mi guía incondicional, por llenarme de fuerzas, y Dora Leticia por haberme brindado las mejores cosas, por hacerme una persona de bien, por estar siempre aun cuando no la pueda ver, este logro es suyo principalmente. A mis hermanos Walter, Mafe y Zamir por mantener el amor y la unidad que nos caracteriza, por su apoyo y su fe inagotable en mis capacidades, a mi sobrino Juan José amor de mi vida, felicidad de nuestros días, David por llenarme de amor, sus cuidados, su confianza en mí y alegrar mi vida día a día.

Camila A.S

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a Dios por permitirnos llegar a este punto del camino, a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca nuestra alma mater por enriquecernos día a día de mil conocimientos que fueron formando un amor inexplicable por esta linda profesión y a los docentes encargados de acompañarnos en este proceso.

Al grupo de investigación de genética Molecular animal de la Universidad Nacional de Colombia por abrirnos las puertas de su laboratorio para poder llevar a cabo este proyecto haciéndonos sentir como en casa, al doctor Manuel Fernando Ariza director del grupo de investigación, a la profesora Yurany Ortiz, por su apoyo incondicional en el desarrollo de este trabajo y en la vida de cada uno de los integrantes del grupo. Edicson Rincón, José Isidro Vargas y Patricia Cifuentes por sus amplios conocimientos y siempre estar dispuestos a brindarnos la orientación necesaria para que todo esto culminara de la mejor manera. A nuestros amigos Juan Pablo, Paul y Edna gracias por ponerle la mejor actitud a los momentos de adversidad, por ser cómplices y amigos, por convertir el laboratorio en nuestra casa y el grupo de investigación en una familia.

A nuestras asesoras, Carolina Jaime por su acompañamiento en este proceso y sus aportes para que el proyecto fuera realizado con éxito y Susan Lorena Castro por la confianza brindada, por creer en nuestras capacidades, impulsarnos a ser mejores profesionales pero sobre todo a ser mejores personas cada día, por su paciencia inagotable y por permitirnos hacer parte de su vida, gracias por mostrarnos las cosas con una perspectiva diferente llena de sueños, por ayudarnos a crecer en todos los aspectos de nuestras vidas, por ser docente pero más que eso por ser amiga, el más profundo respeto y admiración es lo que sentimos.

Hoy elevo mis agradecimientos personales a Dios por darme tanta fortaleza y estar siempre conmigo, a mis padres que con sus grandes consejos me llevaron a ser la persona que soy hoy, por su infinita confianza y darme a entender que todo lo puedo hacer si estamos juntos, a mis hermanos y abuelos por su incondicional amor y hacerme saber a diario lo orgullosos que estaban del camino que había decidido tomar por el resto de mis días, a mi familia por poner su granito de arena en este camino que estoy a punto de culminar y finalmente a mis amigas Pao, Aleja A y Has, a pesar de las adversidades permanecemos juntas desde el principio hasta el fin del camino empujándonos una a la otra para terminar completas y a las que llegaron para quedarse Cami, Jen, Natha, Aleja S y Carol gracias por alegrarme los días, por tanto apoyo enseñándome a creer en mis capacidades, mostrándome el lado alegre de las cosas no tan buenas, por cumplir este sueño conmigo.

Paola A.N

A Dios por no desampararme nunca, por brindarme la fuerza que necesito cada día, por nunca soltar mi mano y bendecirme en cada paso que doy, por su gran misericordia y por cada una de las cosas con las que llena mi vida, a mis padres por haberme acompañado desde el momento en que di el primer paso de mi vida, a mi madre en el cielo por enseñarme a ser la guerrera que siempre fue, por mostrarme el camino correcto y prepararme ante las adversidades que se puedan presentar, todo mi amor esta allá arriba y siempre agradeceré a la vida el haber tenido a la mejor persona en el mundo, mi mamá, mi amiga, mi confidente y mi amor eterno. A mis hermanos por su apoyo incondicional, por la confianza depositada, por las risas, los juegos, las ganas de seguir, son mi gran fortaleza. A mi familia por brindarme su amor y por mostrarme lo orgullosos que están de mí, espero no defraudarlos. A David por su amor infinito y real y por ser parte fundamental desde el inicio de este proceso. Finalmente, a mis compañeros y amigos Francy, Alejandra R, Cristian, Lorena B, Daniel, Brandon, Greisy, Sonia. A mis cómplices de risas, compañeras de vida, por brindarme su amistad y su amor Pao N, Has, Mayda, Lore M, Laura T, Alejandra V, Paola V y Alejandra A. Al fin todos cumpliremos la meta que nos unió.

Camila A.S

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	2
1. ANTECEDENTES.....	5
2. MARCO REFERENCIAL	9
2.1. Productos cárnicos.....	9
2.2. Clasificación de productos cárnicos	9
2.2.1. Clasificación de los productos cárnicos curados	10
2.3. Proceso de elaboración del producto cárnico crudo curado (Jamón)	11
2.3.1. Etapa de Salazón	11
2.3.2. Post salazón	12
2.3.3. Secado y maduración	12
2.4. Calidad microbiológica	14
2.4.1. Microbiota normal	14
2.4.2. Condiciones de proliferación	15
2.4.3. Alteraciones de la carne	16
2.4.4. Patógenos	18
2.4.5. Límites microbiológicos permitidos	23
2.5. Cultivos iniciadores o starters	23
2.5.1. Características de los cultivos iniciadores	24
2.5.2. Clasificación de los cultivos iniciadores	24
2.5.3. Funciones de los cultivos iniciadores.....	25
2.6. Microorganismos utilizados como cultivos iniciadores	31
2.7. Cultivos iniciadores en la elaboración del producto cárnico	32
2.7.1. Bacterias ácido-lácticas	32
2.7.2. Cocos Gram positivos catalasa positivos CGC+.....	33
2.7.3. Mohos y levaduras.....	34
2.8. Cultivos utilizados en la elaboración del producto.....	37
2.8.1. Staphylococcus xylosus	37
2.8.2. Lactobacillus plantarum	38
2.8.3. Pediococcus pentosaceus	39
2.9. Aplicaciones de los cultivos iniciadores	41

3. DISEÑO METODOLOGICO	42
3.1. Universo, Población y muestra.....	42
3.3.1 Selección y preparación de la materia prima	43
3.3.2. Elaboración del producto cárnico	44
3.3.2.1. Masajeado de las piezas cárnicas	44
3.3.2.2 Salado de las piezas cárnicas	44
3.3.2.3. Proceso de post salado	45
3.3.2.4. Secado y maduración	45
3.4. Análisis sensorial	45
3.5. Determinación de microorganismos contaminantes, análisis de control de calidad.....	45
3.5.1. Recolección de muestras	45
3.5.2. Inoculación de muestras	46
3.6. Recuento de cultivos iniciadores.....	46
4. RESULTADOS	47
4.1. Análisis de microorganismos indicadores de calidad.....	47
4.1.1. <i>Staphylococcus coagulasa positiva (S. aureus)</i>	47
4.1.2. <i>NMP Coliformes</i> totales y fecales	48
4.1.3. Recuento de Mesófilos aerobios.....	49
4.1.4. Detección de <i>Salmonella spp</i>	51
4.1.5. <i>Listeria monocytogenes</i>	52
4.1.6. Esporas <i>Clostridium</i> sulfito reductor	54
4.2. Recuento de cultivos iniciadores.....	56
4.2.1. Recuento bacterias ácido lácticas.....	56
4.2.2. Recuento de <i>Staphylococcus xylosus</i>	57
4.2.3. Comparación entre crecimiento de bacterias ácido lácticas y <i>Staphylococcus xylosus</i>	59
4.3. Análisis fisicoquímico	60
4.3.1. pH (potencial de hidrogeno).....	60
4.3.2. Análisis de la actividad de agua.....	60
4.3.3. Medición de cloruro de sodio	62
4.4. Análisis sensorial	63
4.5. Producto final	64

5. DISCUSIÓN	65
6. CONCLUSIONES.....	73
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
ANEXOS	85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características fisiológicas de Clostridium spp.....	22
Tabla 2. Requisitos microbiológicos para productos cárnicos crudo curados.....	23
Tabla 3. Principales características de los cultivos iniciadores	24
Tabla 4. Clasificación de cultivos iniciadores	25
Tabla 5. Composición de algunos cultivos iniciadores comerciales utilizados para la fermentación de la carne	36
Tabla 6. Aplicaciones de los cultivos starter.	41
Tabla 7. Reporte análisis microbiológico.	55
Tabla 8. Recuentos totales de bacterias acido lácticas	95
Tabla 9. Recuentos totales de bacterias Staphylococcus xylosus	95
Tabla 10. Medición semanal de pH durante el proceso de elaboración del producto.	96
Tabla 11. pH promedio en tres etapas de la elaboración del producto cárnico.	96
Tabla 12. Resultados actividad de agua promedio de cada tratamiento durante la elaboración del producto cárnico.....	97
Tabla 13. Resultados difusión de sal en el producto, (Cloruro de Na%).	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo del proceso de elaboración del jamón crudo curado	13
Figura 2. Vía homofermentativa.	27
Figura 3. Vía heterofermentativa.	27
Figura 4. Bacteriocinas producidas por BAL.....	30
Figura 5. Características fenotípicas de las diferentes especies de Staphylococcus coagulasa negativos.....	38
Figura 6. <i>Características generales cultivos starter utilizados.</i>	40
Figura 7. Recuento en placa de Staphylococcus coagulasa positiva. Fotos autores	47
Figura 8. Prueba confirmatoria coagulasa.....	48
Figura 9. Coliformes totales y fecales en la etapa 0 (materia prima).....	48
Figura 10. NMP Coliformes. A. etapa de post-salado; B. etapa de maduración	49
Figura 11. <i>Recuento de mesofilos en agar plate count en la etapa 0 (materia prima)</i> ...	49
Figura 12. Recuento de mesofilos en agar plate count en la etapa de post-salado	50
Figura 13. Recuento de mesofilos en agar plate count en la etapa de maduración	50
Figura 14. Detección de Salmonella spp. en la etapa de materia prima.....	51
Figura 15. Detección de Salmonella spp. en la etapa de Post-salado.....	51
Figura 16. Detección de Salmonella spp. en la etapa de maduración.....	52
Figura 17. Control Listeria monocytogenes en CHROMagar™	52
Figura 18. Detección de Listeria monocytogenes.....	53
Figura 19. Recuento Clostridium sulfito reductor, etapa materia prima.	54
Figura 20. Recuento Clostridium sulfito reductor, etapa post-salado.	54
Figura 21. Recuento Clostridium sulfito reductor, etapa maduración.	55

Figura 22. Recuento en placa bacterias acido lacticas.....	56
Figura 23. Crecimiento de BAL en dos etapas del proceso de elaboración del producto carnico.....	57
Figura 24. Recuento en placa <i>Staphylococcus xylosus</i>	58
Figura 25. Crecimiento de <i>Staphylococcus xylosus</i> en dos etapas del proceso de elaboración del producto carnico.....	58
Figura 26. Identificación de <i>Staphylococcus xylosus</i> mediante el método BBL crystal..	59
Figura 27. Comparación de pH entre las etapas de materia prima, post-salado y maduración.....	60
Figura 28. Actividad de agua promedio en tres etapas de la elaboración del producto cárnico.....	61
Figura 29. Determinación de la concentración de cloruro de sodio.	62
Figura 30. Percepción del consumidor (producto de mayor preferencia).	62
Figura 31. Percepción del consumidor (sabor del producto consumido).	64
Figura 32. Producto final presentado para el análisis sensorial.	64

RESUMEN

Los productos cárnicos crudo curados son aquellos sometidos a un proceso de maduración realizado a través de la adición de sales, condiciones de temperatura y humedad que modifican sus características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales.

El producto reconocido a nivel mundial es el jamón serrano hecho a partir de carne de cerdo, en este proyecto se realizó la elaboración de un producto cárnico similar a partir de piernas de cordero además de determinar el efecto del uso de microorganismos iniciadores sobre las características fisicoquímicas y microbiológicas en la elaboración de este.

Se seleccionaron 40 perniles de cordero los cuales fueron divididos en cuatro tratamientos a los cuales se les realizó el control de calidad tomando muestras representativas de cada lote, este se hizo en 3 etapas diferentes del procesamiento que fueron, recepción de materia prima, post salado y maduración, se analizaron parámetros fisicoquímicos como pH, actividad de agua, concentración de sales y a partir de la etapa de post salado se realizó el recuento de los cultivos iniciadores en los tratamientos 3 y 4.

El análisis de calidad se mantuvo dentro de los límites permisibles proporcionados por la norma técnica colombiana 1325, también se evidencio un aumento del crecimiento de cocos Gram positivos catalasa positiva en todo el proceso, en comparación con los recuentos de bacterias ácido-lácticas que solo se hallaron en las primeras etapas de la maduración, estos resultados se relacionan directamente con los parámetros fisicoquímicos como pH, actividad de agua y concentraciones de sal.

Palabras clave: Bacterias ácido-lácticas (BAL), cultivos estándar, indicadores de calidad, *Staphylococcus xylosus*, producto cárnico, sales curantes, Normas técnicas colombianas (NTC), cadena cárnica ovina.

INTRODUCCIÓN

La industria cárnica colombiana se divide en tres grandes grupos: productos cárnicos cocidos (embutidos cárnicos), procesados crudo curados y enlatados; los cuales se diferencian por criterios establecidos como base de masas, materias primas, tratamientos termino, entre otros.

El proceso de generar productos cárnicos crudo curados como el jamón se demora aproximadamente 6 meses, este es sometido a técnicas que modifican sus características organolépticas y su conservación. Generalmente, se realiza con la adición de sales que ayudan a la conservación del producto debido a la inhibición del crecimiento y multiplicación de microorganismos alterantes a excepción de los microorganismos halófilos que contribuyen al proceso de curado.

Teniendo en cuenta lo anterior, el proceso normal de maduración de la carne es muy largo y es posible que la proliferación de microorganismos patógenos para el ser humano sea mayor aumentando el riesgo de intoxicación alimentaria y enfermedades transmitidas por alimentos, además los índices de producción disminuyen, lo cual perjudica a la industria de productos cárnicos.

Gracias a la aplicación de cultivos microbianos el proceso de maduración de los productos cárnicos como el jamón se hace más rápido y mejora la calidad con respecto al aroma y la textura de este. Estos cultivos microbianos deben cumplir ciertos requerimientos para poder ser utilizados, uno de los más importantes es que no sean patógenos para el hombre, por ello se hace importante el análisis microbiológico y las buenas prácticas de higiene, además estos cultivos contienen características inhibitorias gracias a sustancias no antibióticas que permiten reducir el riesgo de proliferación de posibles microorganismos alterantes y/o patógenos que puedan causar enfermedades transmitidas por alimentos.

En este caso, la materia prima utilizada fue pernil de cordero a diferencia del producto mayormente comercializado hecho a base de carne de cerdo. La industria cárnica ovina es un campo poco relevante en Colombia por lo tanto es importante implementar un producto a base de pierna de ovino que sea agradable para los consumidores y a su vez cuente con la inocuidad necesaria para su posterior comercialización y en un futuro sea tomado como un producto de exportación de la industria cárnica colombiana.

El jamón serrano se obtiene generalmente de la pierna trasera del cerdo, es curada y deshidratada parcialmente para su maduración. Esta carne sufre diversas transformaciones lo que provoca un aumento en la cantidad proteínas y disminución de grasas, como característica particular esta clase de jamón contiene menos grasa, agua y proteínas que el jamón cocido común.

El uso de sustancias antimicrobianas en la industria de alimentos no se encuentra aún en el mercado, sin embargo, existen estudios sobre las potenciales ventajas de la aplicación de estas sustancias en la carne y productos cárnicos (Burgos, J. et.al. 2011). Según Vásquez, S et.al. En 2009 la aplicación de las BAL como cultivo iniciador conlleva ventajas, la principal es la inhibición de microorganismos patógenos como *L. monocytogenes* y la mejora en las características sensoriales, lo cual es una idea para la conservación de carnes y otros productos alimenticios.

Por lo anterior el objetivo general de este estudio fue determinar el efecto del uso de microorganismos iniciadores sobre las características fisicoquímicas y microbiológicas en la elaboración de jamones crudo-curados a partir de piernas de cordero. Para el cumplimiento de este se plantearon los siguientes objetivos específicos:

Determinar la calidad microbiológica de los productos durante todo el proceso de elaboración y del producto final.

Describir el comportamiento de los microorganismos iniciadores en dos fases del proceso de producción.

Analizar las características fisicoquímicas durante el proceso de elaboración de los jamones.

Determinar si los cultivos iniciadores proporcionan mejores características sensoriales al producto terminado.

1. ANTECEDENTES

El procesamiento del jamón curado data de años como 1993 donde autores como Arnau estudió la tecnología y la elaboración del jamón curado donde intervienen diversos factores como la temperatura, PH y actividad del agua (A_w), así mismo se tiene en cuenta cada fase del proceso de elaboración y las condiciones que estas requieren para generar un producto inocuo y con características organolépticas específicas requeridas en el producto.²

En 1999 Mata.C realizó un estudio sobre un embutido crudo curado tipo salchichón donde se fabricaron cinco lotes con 42 piezas cada uno, dos de esos con cultivos iniciadores, dos con bioconservadores y al último no se le adiciono nada. Este estudio buscaba comparar la acción bioconservadora en cada tratamiento y a su vez comparar las características organolépticas obtenidas en cada tipo de producto y así evaluar la acción de los cultivos iniciadores en el producto. Este estudio no mostró diferencias significativas y todos los lotes cumplían la norma de calidad.³

En 2005 un estudio realizado por Martín Juárez B sobre el análisis de las comunidades microbianas que contenían embutidos fermentados ligeramente acidificados cuyos principales productos fueron salchichón y chorizo donde se encontró que las principales especies aisladas en este tipo de productos fueron *Lactobacillus sakei* y *Staphylococcus xylosus* en todas las muestras analizadas. En este caso la identificación de especies se hizo a través de técnicas moleculares las cuales permiten una detección más rápida y segura en las muestras de embutidos.⁴

El instituto de investigación para la industria alimentaria en la Habana, Cuba 2008 presentó un estudio realizado por Beldarraín T. y colaboradores el cual consistió en la caracterización de cultivos iniciadores en un embutido a partir de carne de cerdo con el fin de evaluar propiedades tecnológicas de 5 cultivos, para ello se realizaron 11 variantes que contenían diferentes mezclas de estos.⁵

En este estudio se demostró que todos los cultivos se consideraron aptos para su empleo como cultivos iniciadores en la industria cárnica ya que además de contribuir en las características organolépticas del producto sirvieron como cultivos protectores gracias a la producción de diferentes sustancias inhibitorias y al desplazamiento de la flora acompañante del producto cárnico.⁵

En 2008 Torres I. realizó un producto fermentado seco madurado tipo salami estilo pasabocas al cual se le añadieron cepas comunes de fermentación y cepas probióticas para la obtención de un producto con características organolépticas duraderas e inocuo. Para la elaboración de dicho producto se hizo la formulación de aditivos y cultivos para así mismo utilizarlos en mezclas diferentes y demostrar la viabilidad de estos. Se determinó que el producto fue viable en su totalidad debido a las características organolépticas y el hecho de que su realización no requiere de una gran tecnología, además, la materia prima e insumos son de fácil adquisición.⁶

En el 2009 Domínguez, D realizó un estudio de 3 piernas de cerdo para un jamón crudo curado en la Escuela Agrícola Panamericana donde se utilizaron 3 mezclas de cultivos iniciadores con el fin de acelerar el proceso de maduración, también se analizaron propiedades como color, olor, sabor y otras características fisicoquímicas. No se encontraron diferencias significativas entre los 3 tratamientos, pero si se evidenció que en uno de los tratamientos la textura y el corte eran más aceptados, se evidenció que los 3 tratamientos presentaron recuentos de Coliformes, pero todos se encontraban dentro del rango establecido para este país.⁷

Sancho Bañón en el año 2011 analizó la actividad tecnológica de 2 cultivos iniciadores utilizados comúnmente para la maduración de chorizos y salchichón, este estudio se realizó en la universidad de Murcia donde estos cultivos eran acidificantes y enriquecidos con *Staphylococcus* más un cultivo tradicional, aquí se determinaron parámetros de maduración y propiedades organolépticas. Se observó una notable diferencia en el pH de cada una de las mezclas de cultivos, pero no se encontró una relevancia en las características organolépticas de los productos analizados y solo se observó una variación en la humedad y cantidad de grasa.⁸

Los embutidos fermentados curados son los productos cárnicos que cuentan en su mayoría con adición de cultivos iniciadores. Rubio R. en 2014 desarrolló un estudio en el que se buscaba el desarrollo de un embutido fermentado curado con menor cantidad de sal y grasa y con la adición de BAL (Bacterias ácido lácticas), principalmente *Lactobacillus* aisladas de muestras humanas de las cuales se seleccionó la cepa con mayor viabilidad como cultivo iniciador (*L. rhamnosus*) y se inoculó en el producto con el fin de obtener un producto con mejores características organolépticas y beneficioso para la salud, debido a sus propiedades de inhibición de microorganismos alterantes, su función probiótica y la reducción de sal y grasas en el producto. Como resultado se obtuvo un producto de baja acidez con gran potencial funcional, con calidad microbiológica y características organolépticas adecuadas para el consumo.⁹

En la universidad Complutense de Madrid en el año 2016 el doctor Xavier Fernández estudió el efecto de reducción de las sales nitrificantes en la calidad microbiológica de los embutidos crudo-curados ya que estas sales pueden tener efectos cancerígenos y mutágenos en las personas, por tal razón se realizó este proyecto en productos cárnicos con diferentes cantidades de sales nitrificantes para determinar la influencia que esta tiene sobre la inocuidad del producto. Se observó que la disminución de un 25% o más de nitratos y nitritos permite la proliferación de cocos Gram positivos catalasa positiva y algunas especies de enterobacterias rechazando el producto para su comercialización. El uso de nitratos y nitritos ofrece ventajas para la esterilidad del producto, pero también deberá tenerse muy en cuenta sus posibles efectos toxicológicos.¹⁰

Los estudios analizados anteriormente muestran que el uso de cultivos iniciadores en productos cárnicos se ha venido desarrollando desde hace casi dos décadas o más, sin embargo, es importante destacar que el estudio a desarrollar no es precisamente en embutidos, sino que por el contrario se quiere realizar en un producto cárnico crudo madurado tipo jamón serrano.

Carla María Blanco et al. (2016) realizaron un estudio en la universidad de la sabana acerca de la inactivación de *Listeria monocytogenes* por la adición de un cultivo iniciador en un salami donde se determinó la acción de este cultivo sobre el microorganismo patógeno específico inhibiendo su crecimiento en la etapa de maduración y fermentación del producto sin adición de ningún otro componente como sales nitrificantes donde los resultados fueron de un 86.4% de efectividad. Lo que nos indica que se podría sustituir parcialmente las sales nitrificantes por los cultivos iniciadores debido a su gran potencial de inhibición microbiana que este posee.¹¹

En la actualidad, el uso de carne de ovino para la realización de un producto cárnico crudo curado se ha hecho una vez y es un precedente importante para el desarrollo del proyecto a realizar pues en este se muestran los pasos del proceso de elaboración del producto cárnico teniendo en cuenta que es carne de ovino y gracias a este trabajo se cuenta con un protocolo estandarizado para la realización del producto. Este trabajo fue realizado por Adriana Rada en el año 2015 en la Universidad Nacional de Colombia y consistió en el desarrollo de un producto cárnico crudo curado con piezas enteras de ovino y en el que se realizó el análisis de los parámetros fisicoquímicos y sensoriales en cada una de las etapas de la elaboración de este dando como resultado un producto con buenas características organolépticas y aceptable para el consumidor.¹²

En contraste con lo realizado el proyecto busca la elaboración de un producto cárnico crudo curado estilo jamón serrano a partir de piernas de ovino con la adición de cultivos iniciadores y el análisis microbiológico en el procesamiento de este. Con lo anterior, se quiere evaluar el efecto de los cultivos iniciadores en el producto y comparar las características que se obtendrán en cada uno de los tratamientos.

La Norma técnica colombiana 1325 del 2008 sobre productos cárnicos procesados no enlatados establece los lineamientos que deben seguirse para la realización de estos alimentos. Esta define las normas establecidas para el análisis microbiológico y fisicoquímico, así como sus requisitos de calidad teniendo en cuenta el tipo de producto y las condiciones a las que se encuentra sometido.¹³

2. MARCO REFERENCIAL

2.1. Productos cárnicos

Producto elaborado a base de carne y subproductos comestibles de un animal específico autorizado para el consumo humano que pueden o no tener algunos ingredientes adicionales, son ricos en proteínas, minerales, ácidos grasos, vitaminas y otros componentes que ayudan siendo un aporte nutricional.¹⁴

2.2. Clasificación de productos cárnicos

La clasificación de los productos cárnicos se basa en diferentes criterios ya establecidos los cuales son los tipos de materias primas, base de las masas, si son o no sometidas a tratamientos térmicos, procesos de elaboración, tiempos de maduración entre otros. En Colombia se establecen 3 grandes clasificaciones las cuales son: producto procesado cocido, producto procesado enlatados y productos procesados crudos que estos a su vez pueden ser frescos o crudo madurados.¹⁵

La aplicación o no de tratamiento térmico en los productos crudo curado son la principal característica debido que este tiene como principal objetivo eliminar microorganismos e inactivar enzimas lo cual es fundamental para la durabilidad, calidad y seguridad del producto. En esta fase también se alcanzan los cambios deseables de sus características organolépticas, una estabilidad y seguridad sanitaria satisfactoria por medio de los procesos de fermentación, secado o salado.¹⁵

Para su proceso de maduración se realiza un desecado, maduración, ahumado y almacenamiento en condiciones ambientales, esta maduración es lenta y se desarrollan las características típicas de mejor manera que en la maduración rápida, en este proceso se deberá tener muy en cuenta las condiciones de temperatura, ventilación y humedad para una buena maduración, generalmente se utiliza nitrato para la maduración lenta y sal curante con nitrito para la maduración rápida.

Se puede realizar este proceso por 2 tipos de maduración: Maduración en seco y al vacío.

La maduración en seco es el método industrial más utilizado el cual consiste en mantener las piezas cárnicas en temperaturas muy bajas en un intervalo de 0-4 ° C y una humedad relativa controlada aproximadamente del 80%, estos factores generaran una oxidación que producirá una deshidratación en la pieza cárnica y un cambio en el perfil microbiano. Estas reacciones producirán cambios relevantes en las características organolépticas del producto cárnico.¹⁶

La maduración al vacío es una técnica -menos utilizada a nivel industrial la cual consiste en envasar las carnes en bolsas y sellarlas posterior a esto se le extraerá el aire minimizando el contacto con gases y humedad del ambiente, esto ayudará a aumentar la vida útil del producto ya que impide el desarrollo de bacterias que generan la descomposición del producto cárnico a su vez estas condiciones ayudaran al proceso de maduración y sus características organolépticas específicas.¹⁶

2.2.1. Clasificación de los productos cárnicos curados

El proceso de curado se basa principalmente en la adición de sales y nitrito que generan cambios en el aroma, color y textura. En este proceso se pueden adicionar sustancias coadyuvantes que ayudan al desarrollo y estabilización de color característico del producto. Este proceso ejerce un efecto bacteriostático sobre microorganismos patógenos que puedan alterar la calidad del producto.

Los productos cárnicos curados pueden clasificarse teniendo en cuenta si han sido sometidos a tratamiento térmico o no, en productos cocidos y crudo curado.

Producto cocido: Estos productos se fundamentan en la inmersión de las carnes en unas elevadas concentraciones de sal, seguidas de una cocción y un proceso de ahumado si se cree necesario.¹⁷

Producto crudo curado: Se realiza mediante una adición de sales de curado sobre la superficie del producto cárnico, posterior a esto el producto se dejará madurar durante un tiempo determinado dependiendo el producto que se quiera realizar el cual puede varias entre meses y años. También se pueden utilizar tratamientos con humo para mejorar su sabor característico.¹⁷

2.3. Proceso de elaboración del producto cárnico crudo curado (Jamón)

Se obtiene a partir de la pierna de cerdo la cual es sometida a concentraciones de sal y secada al aire libre para una deshidratación parcial y después se trata mediante un proceso de maduración.^{1, 18}

La elaboración de este jamón se basa en el curado de la carne con concentraciones elevadas de sal donde se cambia la humedad de los tejidos por un proceso de osmosis, debido a las altas concentraciones de sal se logra la inhibición de los microorganismos patógenos que puedan alterar la composición del producto, solamente crecen microorganismos halófilos que son capaces de resistir estas condiciones y ayudan al proceso de maduración.¹⁸

Se desarrollan las acciones previas a todo el proceso de salazón en las materias primas, haciendo controles de calidad y desinfección de todos los utensilios utilizados para este procedimiento. Se tiene en cuenta la cadena de frío que deberá tener el producto cárnico desde el momento del sacrificio hasta su posterior recepción.

2.3.1. Etapa de Salazón

En esta fase se adicionan diferentes concentraciones de sal, esta es responsable de la pérdida de agua del producto en la fase de secado, su estabilidad e inhibición de microorganismos patógenos. También se deben agregar los demás ingredientes que lleva el producto y se procede a un amasado, esto se deja en refrigeración de 24-48 horas para que los ingredientes sean incorporados de forma correcta. El embutido se debe madurar al vacío para eliminar los excedentes de oxígeno ya que esto puede alterar las propiedades organolépticas del producto.^{1, 19}

En la masa del producto existe una población microbiana que depende de los factores intrínsecos de la carne, la grasa, la manipulación de los compuestos y condiciones higiénicas en las que se elaboraron los productos.^{18, 19}

Cuando no se adicionan cultivos iniciadores, la microbiota de la masa es muy variada y similar a la que se puede encontrar en la carne fresca: bacterias ácido lácticas (BAL), *Micrococcaceae* y *Staphylococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas Spp.*, *Brochothrix thermosphacta*, mohos y levaduras entre otros, en condiciones higiénicas deficientes también podrían encontrarse microorganismos patógenos como *Salmonella Spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* o bacterias esporuladas. Cuando se les adiciona sal y azúcar la actividad de agua se reduce y permite que los microorganismos puedan seguir multiplicándose en el producto.^{18,19}

2.3.2. Post salazón

En esta etapa se busca la homogenización completa de las sales y los otros ingredientes adicionados en la etapa anterior en todo el producto cárnico. Este proceso se realiza generalmente en cámaras de secado donde se controla temperatura y humedad relativa oscilando entre 3-5 °C y la humedad relativa entre 80-90% y se debe dejar en un periodo de tiempo entre 40 a 60 días. El uso de temperaturas bajas ayuda a la inhibición de los microorganismos patógenos.¹⁹

2.3.3. Secado y maduración

Esta fase se realiza en una cámara una temperatura de 12-15°C y una humedad relativa progresivamente decreciente habitualmente de 84-87%, también se debe tener en cuenta la correcta circulación del aire para que el secado sea homogéneo. Estas condiciones son críticas y deberán tener un riguroso cuidado para evitar la formación de costra superficial que constituye uno de los defectos de fabricación más frecuentes.

La duración de esta etapa depende del tipo del producto y puede variar entre semanas o meses.^{18,19}

En esta fase, el contenido de agua del embutido desciende hasta un 35% o incluso a valores inferiores, lo que supone una pérdida de peso de al menos un 20%.¹⁹

En este período se produce la maduración, en la que tienen lugar distintas reacciones químicas y enzimáticas (catalizadas tanto por enzimas tisulares como microbianas) en las que se generan numerosos compuestos que participan en el sabor y aroma. Si la humedad relativa es baja puede aparecer en los embutidos sin ahumar o suavemente ahumados una microbiota superficial compuesta por mohos y levaduras. ^{18,19}

En la figura 1 se muestra el proceso de elaboración de producto con cada etapa del proceso.

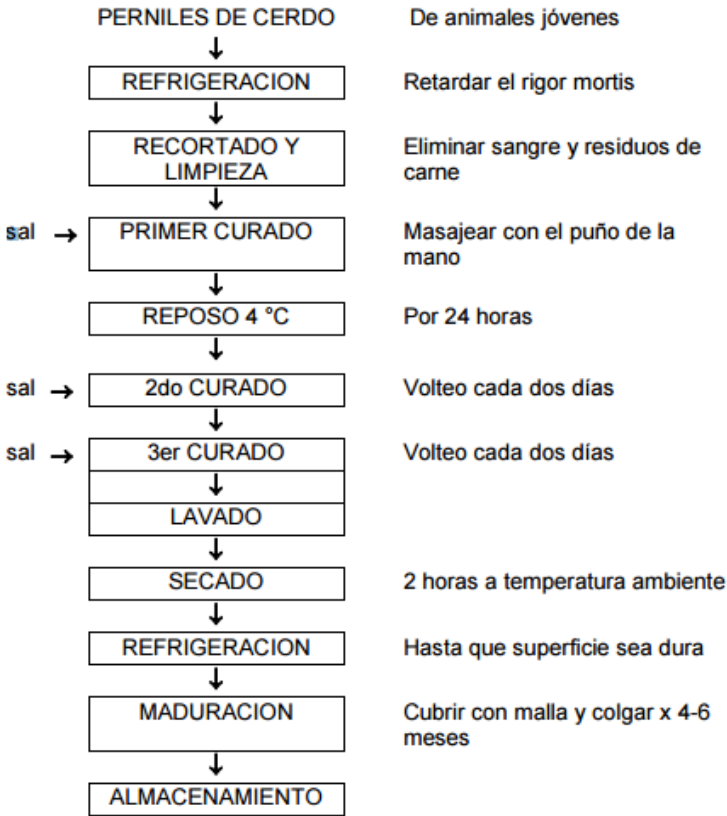


Figura 1. Diagrama de flujo del proceso de elaboración del jamón crudo curado.¹⁸

2.4. Calidad microbiológica

Las características físicas típicas de la carne fresca y su contenido nutricional hacen que esta sea un alimento altamente perecedero, pero dependiendo el tipo específico de producto cárnico que se esté realizando tendrá cierta microbiota particular. Estos alimentos son muy susceptibles a la contaminación por el crecimiento de microorganismos patógenos que pueden llegar a causar enfermedades de intoxicación alimentaria sobre todo en temperaturas por encima de la refrigeración afectando directamente las características organolépticas.¹⁹

2.4.1. Microbiota normal

La microbiota típica de los productos cárnicos crudo curados está constituida generalmente por bacterias ácido lácticas (BAL) y cocos Gram positivos catalasa positiva (CGC+), ya que estos microorganismos son los principales participantes en la maduración del producto cárnico contribuyendo a su fermentación, ayudados con la adición de otras sustancias y de altas concentraciones de sal que inhiben los microorganismos patógenos y ayudan al crecimiento selectivo de los cultivos iniciadores proporcionando mejor calidad al producto.²⁰

Las bacterias ácido lácticas están constituidas principalmente por *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus*, entre otras, se caracterizan por seguir dos rutas metabólicas que pueden ser la vía homofermentativa o la vía heterofermentativa donde se producen concentraciones de ácido láctico que ayudarán en el proceso de fermentación por acción de una disminución del pH, estas bacterias generalmente realizan procesos que ayudan en la producción de aroma y sabor característico al producto.

Por otra parte, se encuentran los cocos Gram positivos catalasa positiva que generalmente son *Staphylococcus xylosus* ya que son predominantes sobre las *BAL*, la actividad específica de esta especie es la capacidad de nitritos y nitratos reductasa que ayudaran al color específico del producto, de igual manera evita la oxidación lipídica que afecta las características organolépticas del mismo. ²⁰

2.4.2. Condiciones de proliferación

La contaminación en los productos cárnicos crudo curados se puede dar por infecciones en el animal vivo o en infecciones post-mortem por una mala manipulación del alimento, estas conllevan a las enfermedades de transmisión alimentaria, en la superficie de los animales se encuentran los microorganismos provenientes del suelo, aire y agua. ¹⁹

Dentro de las condiciones que pueden influir en la proliferación microbiana encontramos los factores de crecimiento y sus condiciones ambientales como pueden ser:

Actividad de agua: Se conoce como un indicador de la fracción del contenido de humedad en un producto específico que es susceptible al crecimiento microbiano donde se llevan a cabo diferentes tipos de reacciones químicas que pueden afectar su equilibrio, esta interfiere directamente con la textura del alimento donde una actividad de agua alta genera un producto jugoso y tierno a diferencia de los alimentos con actividad de agua baja que tienen características como dureza y sequedad. ²¹

pH: Medida que determina la acidez o basicidad de un producto que puede variar entre 0-14, la acidez aumenta cuando el pH disminuye, un producto con un pH menor a 7 se considera ácido, uno mayor a 7 es básico y 7 se clasifica como un producto neutro.

El pH en los productos cárnicos depende de diversos factores como las condiciones en que fue sacrificado el animal, su post-mortem y el tiempo de almacenamiento, esto se debe a que el animal en estos procesos se somete a estrés y desencadena una acción rápida de degradación del ATP que finalmente es quien determina el pH final del producto.²²

Necesidades nutricionales: Después de realizar todos los procesos bioquímicos en la parte del musculo, se dan los nutrientes requeridos para el crecimiento de los microorganismos patógenos como *Escherichia coli*, *Streptococcus faecium* entre otros.²⁰

Temperatura: La temperatura ideal para la proliferación de microorganismos mesófilos se encuentra entre 20-40 °C, por lo cual se debe tener una cadena de frio ya que el rango de temperatura se encuentra muy alto, aunque guardar una cadena de frio no asegura una inocuidad completa del producto debido a que algunos microorganismos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Achromobacter* y *Flavobacterium* son los que frecuentemente se encuentran en carnes frescas sometidas a temperaturas de refrigeración.^{19,20}

2.4.3. Alteraciones de la carne

Los animales vivos son una fuente de contaminación debido a que en ellos se encuentran una diversidad de especies bacterianas donde se encuentran principalmente en las mucosas, órganos externos, genitales, glándulas mamarias entre otros. Los tipos de alteraciones se clasifican dependiendo las condiciones en la que el microorganismo crezca:

2.4.3.1 Anaerobiosis: microorganismos que crecen en ausencia de oxígeno que realizan su proceso metabólico por métodos fermentativos y una respiración anaeróbica. Estos microorganismos pueden producir en los productos cárnicos alteraciones como: agriado, este es el proceso donde la carne

presenta olor y sabor agrio dados por enzimas cárnicas, ácidos lácticos producidos por las bacterias y procesos de proteólisis.

Otra alteración relevante causada por estos microorganismos es la putrefacción que se da por la degradación de proteínas produciendo sustancias tóxicas que aportan olores y sabores indeseables al producto, se da generalmente por bacterias pertenecientes a los géneros *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Micrococcus* y *Bacillus*.^{19,23}

2.4.3.2 Aerobiosis: Microorganismos que necesitan concentraciones de oxígeno para poder crecer y multiplicarse, sobreviven mediante un proceso de respiración celular que utiliza el oxígeno para realizar la oxidación del sustrato, estos microorganismos pueden causar las siguientes alteraciones:

- **Color:** las bacterias anaerobias producen alteraciones en el color característico de la carne, tornándose a colores verdosos, grisáceos o algunas escalas de negro debido a la producción de algunos peróxidos o sulfuros de hidrógeno típicamente en bacterias de géneros como *Clostridium*, *Bacillus* y *Pseudomonas*.^{23,24}
- **Mucosidad superficial:** Esta alteración depende principalmente de factores como la temperatura y la cantidad de agua disponible en el producto que serán los principales componentes para el crecimiento bacteriano. En temperaturas muy bajas la humedad favorece el crecimiento de microorganismos del género *Pseudomonas*, *Achromobacter* y *Flavobacterium*; con menos humedad se ven favorecidos los *Micrococcus* y las levaduras y los mohos.^{19,24}
- **Fluorescencia:** Esta alteración es poco frecuente causado por especies específicas de bacterias como *Flavobacterium*, *Photobacterium*, entre otros.

Estos microorganismos proliferan en la superficie del producto, las coloraciones rojas se dan generalmente por especies de *serratia marcescens*, coloraciones azules por especies de *pseudomonas Spp* y pigmentos amarillos por especies de otros géneros.²⁴

- **Alteraciones por grasas:** Se produce principalmente por bacterias con capacidad de realizar procesos lipolíticos y oxidan algunas sustancias, estas acciones se llevan a cabo por medio de lipasas que se encuentran innatas en la carne y son producidas por algunos microorganismos. Las bacterias productoras de sabor desagradable generalmente son especies de *Pseudomonas* y *Bacillus* o por mohos y levaduras.¹⁹
- **Olores y sabores extraños:** Es llamado comúnmente como husmo que se debe por el crecimiento excesivo de microorganismos patógenos en la superficie del producto, esta es una de las primeras alteraciones que se presentan en este tipo de productos. La carne toma un sabor agrio debido a ácidos volátiles o al crecimiento de algunas levaduras, estas pueden desarrollarse con o sin presencia de oxígeno ya que no son microorganismos exigentes para su crecimiento y dependiendo las condiciones ambientales que el producto tenga se dará la alteración. ¹⁹

2.4.4. Patógenos

Las enfermedades de transmisión alimentaria constituyen un gran problema de salud pública y se dan por la ingestión de alimentos o aguas contaminadas con diversos microorganismos en concentraciones considerables que afectan notablemente la salud del consumidor especialmente a los niños, mujeres embarazadas, personas de la tercera edad o inmunológicamente comprometidas, estas contaminaciones se pueden generar en cualquier etapa del procesamiento del producto y se puede dar por diversos factores como enfermedades de base, medio ambiente o mala manipulación de los alimentos. Entre los síntomas más comunes que se producen estas patologías son síntomas gastrointestinales como náuseas, diarrea vómito entre otros, pero en algunos

casos se pueden presentar complicaciones síntomas neurológicos, ginecológicos, inmunológicos y de otro tipo. ²⁵

En Colombia los principales microorganismos identificados causantes de ETAS son:

Salmonella Spp: Bacilos Gram negativos que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, no esporulado y móvil, existen aproximadamente 2500 serotipos de esta especie los cuales serán clasificados de acuerdo con su antígeno flagelar H y antígeno somático O. Este género tiene un gran impacto en la salud pública por sus brotes epidemiológicos que indican fiebre tifoidea y gastroenteritis a nivel mundial, se debe tener en cuenta que este microorganismo se puede encontrar en el tracto gastrointestinal de los mamíferos por tal razón es muy difícil controlar su presencia en los procedimientos, sin embargo, un hallazgo de concentraciones de salmonella elevado nos indicara una mala manipulación debido a medidas higiénicas deficientes. ²⁵

Se pueden encontrar salmonellas no tifoideas (diferentes a *Salmonella Typhi* y *Salmonella Paratyphi*) y serotipos de salmonella entérica que son las principales causantes de casos registrados de gastroenteritis de origen alimentario sobre todo en producto de origen cárnico.

La enfermedad típica producida por este microorganismo es salmonelosis esta se manifiesta con picos altos de fiebre inesperadamente, diarrea, vomito, dolor abdominal entre otros, esta comienza a manifestarse entre 6-70 horas después de haberse ingerido una concentración considerable del microorganismo y dura aproximadamente de 2-7 días. Esta enfermedad puede tener recuperación sin ningún tipo de tratamiento, sin embargo, en algunos casos especiales como niños, mujeres embarazadas o personas con el sistema inmunológico comprometido si presenta deshidratación y puede llevar a grandes complicaciones. ^{25,26}

Listeria monocytogenes: Bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo, no formador de esporas, tiene la capacidad de crecer en un espectro amplio de temperatura, se encuentra ampliamente difundida en la naturaleza mediante fuentes de contaminación

como la tierra, el agua, materia fecal, entre otros, esta puede causar procesos muy graves en fetos, neonatos, niños y ancianos.

Este microorganismo es productor de listeriosis que es una enfermedad de transmisión alimentaria y se presenta en casos esporádico o brotes eventuales, es una enfermedad poco frecuente pero muy peligrosa, se puede encontrar este microorganismo en instalaciones, utensilios, personal manipulador de alimentos y es capaz de realizar biofilms que dará una contaminación cruzada en el proceso de los alimentos. ^{19,27}

Listeria monocytogenes tiene un periodo de incubación entre 3-70 días, donde se presenta como bacteremia, sepsis, gastroenteritis, enfermedades neuronales, endocarditis, trombo encefalitis y como complicaciones como coagulación intravascular diseminada, fallo renal agudo y síndromes respiratorios con una alta letalidad. ²⁷

Escherichia coli: Bacilo Gram negativo anaerobio facultativo móvil que es microbiota intestinal de animales de sangre caliente, la mayoría de las cepas de E. Coli son inofensiva pero alguna de estas especies pueden causar graves enfermedades a los seres humanos, la toxina shiga es activa a temperaturas entre 8-55 °C con una temperatura optima de 37 °C, esta toxina es la responsable de la intoxicación alimentaria aunque puede destruirse en el momento de la cocción de los alimentos algunos serotipos de esta especie pueden resistir estas altas temperaturas y son las responsables de los brotes epidémicos en la salud pública. ^{25,28}

Los síntomas más frecuentes que indican una intoxicación por este microorganismo incluyen calambres abdominales, diarrea sanguinolenta, fiebre y vómito, con un periodo de incubación entre 3 y 8 días donde los pacientes generalmente tienen un proceso de recuperación en el término de 10 días, pero en algunos casos especiales la infección puede progresar y llevar a una enfermedad mortal produciendo síndrome hemolítico urémico, anemias hemolíticas y otras patologías. La contaminación se puede dar por una deficiente asepsia en el procesamiento de los alimentos debido a una

contaminación fecal, carne y productos lácteos crudos, superficies y utensilios de cocina contaminados que serán los responsables de una contaminación cruzada.^{25,28}

Clostridium botulinum: Bacterias Gram positivas, anaerobias, formadoras de esporas, es potencialmente patógena debido a una neurotoxina que produce el botulismo que es una enfermedad de transmisión alimentaria grave y en algunos casos puede llegar a ser mortal. Las esporas que produce *Clostridium spp.* son termo resistentes por tal razón son muy difíciles de erradicarlas, se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente y se multiplican en ausencia de oxígeno.

Esta toxina se ingiere con los alimentos contaminados con estas esporas que se infectaron inicialmente en el animal y allí proliferaron hasta llegar al consumo humano, esto puede causar alteraciones neuronales, parálisis, flacidez e insuficiencias respiratorias. Otros síntomas pueden incluir fatiga, vértigo, visión borrosa, inflamación abdominal, vomito en proyectil, inflamación abdominal y malestar general.²⁹

Esta bacteria se manifiesta entre las primeras 12-36 horas de la ingestión del alimento contaminado, su incidencia es baja, pero con una tasa de mortalidad alta, se encuentra en alimentos como verduras como espinacas, setas y remolachas, alimentos enlatados o embotellados, productos cárnicos como pescados, jamones, salchichas entre otros embutidos. *Clostridium* comprende 4 grupos fenotípicos diferentes que se muestran en la tabla 1.^{29,30}

En el grupo I y II son cepas de origen proteolítico que tendrán una temperatura mínima de crecimiento con diferencia a las no proteolíticas (10-12 °C frente a 2,5-3 °C) pero estas son un poco más resistentes al pH y a las concentraciones de sal, estas serán las responsables de las alteraciones organolépticas del producto como olores desagradables que aumentarán el riesgo del consumo del alimento.³⁰

Características fisiológicas de *Clostridium botulinum* formadores de neurotoxina.

	Grupo			
	I	II	III	IV
Tipo de toxina	A, B, F	B, E, F	C, D	G
Proteolisis	+	-	-	+
Temperatura óptima de crecimiento	37 °C	25 °C	40 °C	37 °C
Temperatura mínima de crecimiento	10-12 °C	2,5-3,0 °C	15 °C	d.i.
pH mínimo de crecimiento	4,6-4,8	5	d.i.	d.i.
Concentración máxima de NaCl	10%	5%	3%	>3%
A _w mínima de crecimiento	0,94	0,97	d.i.	d.i.

d.i.: datos insuficientes.

Adaptado de: Johnson (2013); Lund y Peck (2000).

Tabla 1. Características fisiológicas de *Clostridium spp.* Tomado del libro de carnes.¹⁹

Staphylococcus coagulasa positiva: Coco Gram positivo anaerobio facultativo productor de enterotoxinas termoestables que se pueden encontrar distribuidos en el medio ambiente y animales siendo transmitidos a los seres humano por medio de la ingesta de algunos alimentos contaminados produciendo ETAS.³¹

Este microorganismo posee unas enterotoxinas muy resistentes y puede sobrevivir por periodos prolongados en diversos ambientes y resistir concentraciones elevadas de sal. Existen 32 especies aproximadamente del género *Staphylococcus*, pero la especie más importante y la principal causante de intoxicación alimentaria según reportes es *Staphylococcus aureus*, este ha sido el responsable de brotes endémicos en muchas partes del mundo donde su patogenicidad se le atribuye principalmente a sus toxinas que pueden ser transmitidas mediante una contaminación cruzada o de persona a persona por una deficiente manipulación de los alimentos.³¹

Los brotes se han asociado a alimentos como leche, queso y diversos productos cárnicos, tendrá un periodo de incubación de 2-4 horas dentro del organismo y se manifestará con síntomas como náuseas, vómito, postración, diarrea, espasmos en el estómago, deshidratación entre otros.

Para que se pueda producir una intoxicación alimentaria es necesario que se encuentre una concentración considerable de la enterotoxina contaminando el alimento, se reporta que esta se debe encontrar aproximadamente en un rango de 0,1 – 1,0 µg/kg y a unas condiciones específicas para su óptimo crecimiento.

31

2.4.5. Límites microbiológicos permitidos

De acuerdo con la norma técnica colombiana 1325 los límites microbiológicos permitidos para productos cárnicos crudo curados, fermentados o acidificados se muestran en la Tabla 2.

Requisito	N	m	M	c
Recuento de coliformes /g	3	<10	200	1
Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva, UFC/g	3	<100	-	-
Recuento de esporas <i>Clostridium</i> sulfito reductor, UFC/g	3	<10	100	1
Detección de <i>Salmonella</i> , /25 g	3	Ausencia	-	-
Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> , /25 g	3	Ausencia	-	-
Recuento de E coli /g	3	<10	-	-
en donde n = número de muestras que se van a examinar m = índice mínimo permisible para identificar nivel de buena calidad M = índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad c = número de muestras permitidas con resultados entre m y M.				

Tabla 2. Requisitos microbiológicos para productos cárnicos crudo curados. Norma técnica colombiana (NTC) 1325, pág. 26.¹³

2.5. Cultivos iniciadores o starters

Son preparaciones de microorganismos que se añaden en la formulación de algunos productos de la industria alimentaria con el objetivo de lograr un mayor control del proceso fermentativo y el desarrollo de características fisicoquímicas y organolépticas, para obtener productos de mayor calidad sensorial e higiénica ya que estos cultivos además de ayudar en el mejoramiento de las características del producto sirven como protectores o inhibidores de microorganismos patógenos.

2.5.1. Características de los cultivos iniciadores

Según Restrepo D. et al. (2001) las características de crecimiento y desarrollo de los cultivos iniciadores que se cuentan en la Tabla 3 son algunas de las características primordiales para elegir las cepas a utilizar teniendo en cuenta los productos que se quieren realizar y el proceso al que serán sometidos.¹⁹

REQUERIMIENTOS
Tolerancia a niveles de nitritos \leq 200 ppm y NaCl 6%
Temperaturas entre 27 y 43°C
No producción de olores ni metabolitos tóxicos
No pueden ser patógenos
Inactivación a temperaturas por encima de 57°C
No pueden producir antibióticos

Tabla 3. Principales características de los cultivos iniciadores

2.5.2. Clasificación de los cultivos iniciadores

Los cultivos iniciadores pueden ser clasificados de acuerdo con tres características:

A. Según su función:

- Primarios: Aquellos microorganismos encargados de la producción de ácido láctico a partir de lactosa.
- Secundarios: Microorganismos encargados del desarrollo y control de características sensoriales como sabor, aroma y textura.³²

B. Según su temperatura óptima de crecimiento:

- Mesófilos: Microorganismos capaces de resistir temperaturas de 30°C como los géneros *Lactococcus spp* y *Leuconostoc spp*.

- Termófilos: Microorganismos capaces de resistir temperaturas de 42°C como *Streptococcus salivariu* y *Lactobacillus spp.*³²

C. Según la composición:

Los cultivos iniciadores pueden ser cepas de una o más especies ya sea de bacterias, hongos o levaduras, en la tabla 2 se muestra los tipos de cultivos iniciadores de acuerdo con el número de cepas y a su caracterización.³³

TIPO DE CULTIVO	CARACTERÍSTICAS
Cultivo de cepa única	Contiene una cepa de una sola especie conocida.
Cultivo definido múltiple	Está formado por diferentes cepas de una especie conocida.
Cultivo definido mixto	Contiene múltiples cepas conocidas de diferentes géneros y especies.
Cultivo indefinido o artesano	Se compone de numerosas cepas de distintos géneros y especies desconocidas o con pocos estudios. (cultivos que se generan naturalmente gracias a las condiciones del producto)

Tabla 4. Clasificación de cultivos iniciadores. ^{32, 33}

2.5.3. Funciones de los cultivos iniciadores

Los cultivos iniciadores tienen diferentes funciones que contribuyen a las características organolépticas del producto final esto se debe al metabolismo de estos y a sus características genéticas entre las funciones principales se encuentran la producción de ácido, así como la actividad proteolítica, actividad lipolítica, la producción de compuestos aromáticos, la producción de CO₂, la síntesis de exopolisacáridos y la producción de compuestos inhibidores.³³

Teniendo en cuenta lo anterior a continuación se explican cada una de las funciones que cumplen los cultivos iniciadores con respecto a su metabolismo el cual es el responsable de añadir características determinadas al producto.

2.5.3.1. Producción de ácido:

Los principales microorganismos productores de ácido son las BAL (bacterias ácido-lácticas), las cuales tienen la capacidad de transformar carbohidratos en ácido láctico utilizando dos vías principales:

Vía homofermentativa: En esta se lleva a cabo la degradación de la glucosa a piruvato por la ruta glucolítica o de Embden-Meyerhof-Parnas obteniéndose ácido láctico como producto principal aproximadamente en un 85% de la fermentación además de otros productos como fórmico, acético y etanol en menor proporción. Cuando la producción es solamente de ácido láctico se debe a un exceso de fuentes de carbono.³³

Entre las bacterias pertenecientes al grupo de las homofermentativas encontramos a los géneros: *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y especies de *Lactobacillus* de los grupos I y II. Este grupo de bacterias poseen las enzimas aldolasa y hexosa isomerasa que son las que llevaran a cabo el proceso de fermentación de la glucosa.³⁴

Vía heterofermentativa: La fermentación de la glucosa se lleva a cabo por la ruta de la fosfocetolasa originando ácido láctico en un 50%, CO₂ y cantidades variables de acético y etanol.³³

En este grupo se encuentran bacterias de los géneros *Leuconostoc* y especies del género *Lactobacillus* del grupo III los cuales poseen la enzima fosfocetolasa, pero no la aldolasa ni la hexosa isomerasa por lo tanto siguen la vía de la hexosa monofosfato o la pentosa.³⁴ En la figura 2 y 3 se muestran las vías homofermentativa y heterofermentativa respectivamente.

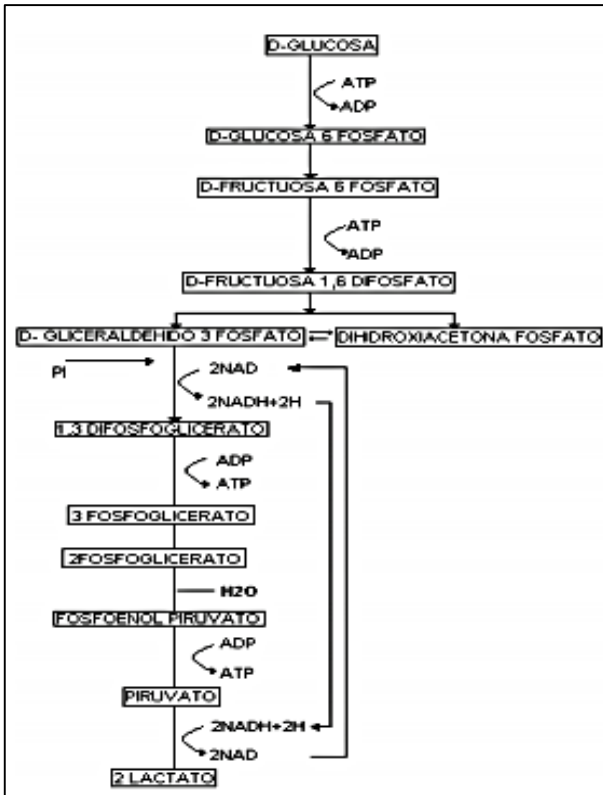


Figura 2. Vía homofermentativa.³⁴

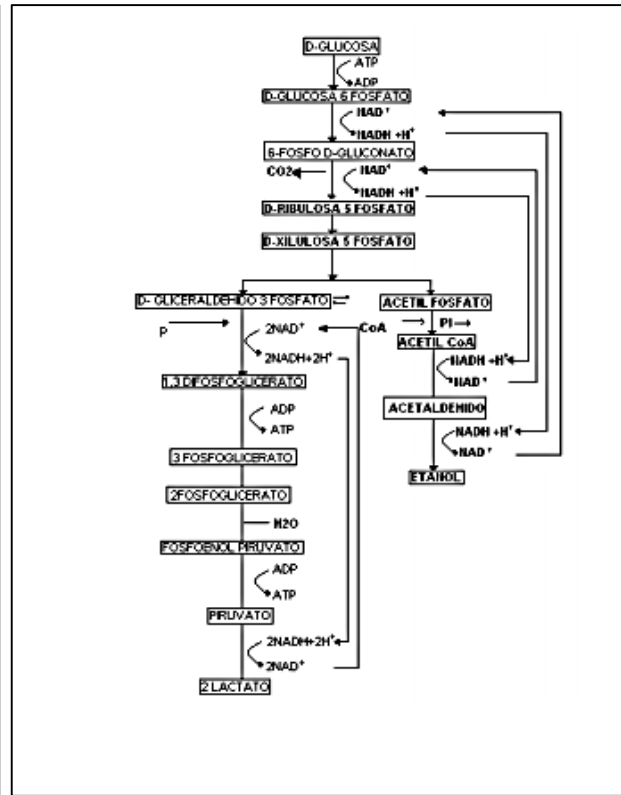


Figura 3. Vía heterofermentativa.³⁴

2.5.3.2. Actividad proteolítica, lipolítica y producción de aromas

Mediada por proteinasas y lipasas extracelulares que favorecen la liberación de aminoácidos esenciales para la formación de las BAL, péptidos, ácidos grasos, oligopéptidos y otras sustancias. Estas reacciones metabólicas son más frecuentes en bacterias del género *Staphylococcus* debido a la cantidad de proteinasas y lipasas, además de su capacidad de resistir altas concentraciones de sal y sus condiciones de crecimiento.³⁵

Lo anterior genera en el producto el desarrollo de textura y aroma mediante la producción de alcohol, cetonas y ésteres que actúan modificando las características organolépticas del producto.³³

2.5.3.3. Producción de exopolisacáridos

La mayoría de las bacterias ácido lácticas tienen la capacidad de sintetizar polisacáridos extracelulares estos son polímeros de un alto peso molecular los cuales ayudan a mejorar la textura, sabor y estabilidad final del producto elaborado.^{33, 34}

Los polisacáridos pueden ser homopolisacáridos los cuales se componen de monosacáridos o heteropolisacáridos compuestos de diversos azúcares como glucosa, galactosa, ramnosa entre otros.³⁶

Además de las características aportadas a los productos de la industria alimentaria, existen beneficios para la salud que tienen los EPS entre ellos se encuentran la capacidad antitumoral, efectos inmunoestimulantes, capacidad anti ulcerante, disminución de niveles del colesterol, mejoramiento de microbiota gastrointestinal, entre otros.³⁴

2.5.3.4. Producción de gas

Esta se realiza generalmente en microorganismos heterofermentativos, sin embargo, también se puede observar producción de gas en algunas especies homofermentativas por medio del metabolismo del citrato. Esta actividad se observa generalmente en la industria de los quesos elaborados con microorganismos.³³

En el caso de los productos cárnicos a la hora de elegir las cepas que servirán como microorganismos iniciadores es importante que se elijan especies homofermentadoras pues se necesita que la producción de ácido láctico sea mayoritaria. La producción de CO₂ no es recomendable ya que genera en el producto condiciones indeseables.³⁷

2.5.3.5. Producción de sustancias inhibidoras

Una de las principales sustancias inhibidoras de microorganismos son las bacteriocinas, las cuales se definen como péptidos de origen ribosomal con capacidad antimicrobiana que no afectan los organismos que las producen. Las BAL se han estudiado además de microorganismos iniciadores como microorganismos protectores debido a su acción inhibidora de flora indeseada mediada por estos péptidos.³⁸

Las características principales de las bacteriocinas producidas por las BAL son importantes para la conservación de alimentos y el mejoramiento de la calidad de estos, entre las más importantes podemos encontrar la baja toxicidad e inactividad frente a células eucariotas.

Son catalogadas como sustancias seguras, su actividad se ve afectada por enzimas proteolíticas, resisten cambios drásticos de pH y temperatura, son bactericidas en un amplio rango de bacterias patógenas o alterantes actuando sobre la membrana citoplasmática de estas y por ende no presentan resistencia cruzada con antibióticos debido a que su mecanismo de acción difiere, además su expresión génica está determinada por plásmidos transferidos ya sea por manipulación genética en la industria o por mecanismos naturales de quorum sensing (comunicación microbiana) entre cepas de importancia industrial.³⁸

Las bacteriocinas producidas por las BAL se pueden clasificar en cuatro clases:

La clase I se conoce como I-antibióticos de amplio espectro con modificaciones post-traduccionales entre ellos podemos encontrar la nisina.³⁹

La clase II se refiere a péptidos termoestables de bajo peso molecular sin modificaciones los cuales son las principales sustancias inhibidoras de patógenos del género *Listeria monocytogenes*.³⁹

La clase III se trata de péptidos termolábiles de mayor tamaño.

La clase IV está constituida por péptidos cíclicos los cuales son moléculas complejas compuestas por fracciones de lípidos y carbohidratos.³⁹

En la figura 4 se muestran algunas bacteriocinas de acuerdo con su clasificación

Bacteriocina	Productor	Espectro de inhibición	Tamaño (Número de aminoácidos)
Clase I: Lantibióticos			
Nisina (A y Z)	<i>Lactococcus lactis</i>	Amplio	34
Lacticina 481	<i>Lactococcus lactis</i>	Amplio	27
Lactocina S	<i>Lactobacillus sake</i>	Amplio	37
Carnocina U149	<i>Carnobacterium piscicola</i>	Amplio	35-37
Clase II: No lantibióticos. Termoestables			
Lactococcina A	<i>Lactococcus lactis</i>	Estrecho	54
Lactococcina B	<i>Lactococcus lactis</i>	Estrecho	47
Lactacin F	<i>Lactobacillus johsonii</i>	Estrecho	57-48
Plantaricina*	<i>Lactobacillus planctarum</i>	Amplio	34
Sakacina P	<i>Lactobacillus sake</i>	Amplio	41
Pediocina AcH	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Amplio	44
Divergicina M35*	<i>Carnobacterium divergens</i>	Amplio	43
Enterocina P*	<i>Enterococcus faecium</i>	Estrecho	44
Clase III: Mayor tamaño, termolábiles			
Helveticina J	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Estrecho	333
Clase IV: Moléculas complejas			
Cicularina A*	<i>Geobacillus kaustophilus</i>	-	76

Figura 4. Bacteriocinas producidas por BAL.³⁹

2.6. Microorganismos utilizados como cultivos iniciadores

Los microorganismos utilizados como cultivos iniciadores son en su gran mayoría bacterias ácido lácticas y la familia Micrococcaceae debido a sus características de resistencia a diferentes condiciones ambientales y nutricionales. Además, su actividad metabólica aporta mejoras en el producto final y acelera su proceso.

También se utilizan especies de levaduras y mohos generalmente en la superficie del producto debido a su capacidad de producción de aromas y mejora de las características sensoriales.

Se ha propuesto la utilización de especies de *Enterobacterias*, *Vibrios* y *Pseudomonas* entre otras.

Bacterias ácido lácticas: Las bacterias lácticas son los microorganismos mayormente utilizados en la industria de lácteos y productos cárnicos debido a su capacidad de producción de ácido láctico mediante la fermentación de azúcares además de contribuir en la disminución del pH que favorece la inhibición de microorganismos patógenos y alterantes, la interacción de otros factores como la presencia de ácidos orgánicos, la presencia de peróxido de hidrógeno y la producción de bacteriocinas son factores que contribuyen a la acción inhibidora de estas bacterias.⁴⁰

Micrococáceas: Las micrococáceas son el segundo grupo de microorganismos más utilizados como cultivos iniciadores. Estos microorganismos contienen beneficios tecnológicos que aportan características como la formación y estabilización del color y formación del aroma debido a que posee la enzima nitrato reductasa la cual actúa en la reducción de nitrato a nitrito, la actividad lipolítica y degradación de aminoácidos libres que favorece también el desarrollo de otra característica como la textura.⁴⁰

Mohos y levaduras: Estos microorganismos específicamente proveen una cobertura superficial que proporciona aspecto, olor y sabor atractivos mediante la reducción de procesos oxidativos, metabolizan peróxidos y ofrecen protección frente a la luz además de evitar el desarrollo de mohos productores de micotoxinas y antibióticos.⁴⁰

2.7. Cultivos iniciadores en la elaboración del producto cárnico

Estos cultivos son preparaciones que se le agregan a los productos cárnicos para acelerar su proceso de fermentación, desarrollar color y aromas típicos que se deseen obtener. Los microorganismos que se le añaden deben ser capaces de crecer en el producto cárnico después de ser inoculado, multiplicarse en condiciones de baja tensión de oxígeno y a las temperaturas utilizadas en el proceso, y tolerar la presencia de nitrito y de altas concentraciones de sal.¹⁷

La utilización de cultivos iniciadores en la industria cárnica generalmente se realiza a los embutidos crudos curados, para los que se emplean bacterias ácido-lácticas (BAL) y cocos Gram positivos catalasa positiva (CGC+), también se puede realizar la fermentación por medio de mohos y levaduras donde se desarrolla una microbiota de superficie.⁵ Estos géneros microbianos tienen reacciones metabólicas básicas que se dan en conjunto durante el proceso de fermentación.⁴¹

2.7.1. Bacterias ácido-lácticas

Las BAL más utilizadas como cultivos starter son los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*, debido a su actividad glucolítica y con ello el posterior descenso del pH lo cual conlleva a la inhibición de bacterias patógenas para el ser humano y/o alterantes del producto.¹⁷

Las especies *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus curvatus* son las más comúnmente aisladas de carnes fermentadas por lo tanto son las mayormente utilizadas como cultivos iniciadores, gracias a su producción principal de ácido láctico confieren al producto beneficios de conservación del producto, desnaturalización de proteínas que proveen al producto desarrollo de textura, actividad enzimática que ayuda en la producción de aromas y reducción de nitratos a nitritos contribuyendo a la producción de color.^{41,42}

L. sakei es la especie mayormente utilizada como cultivo iniciador debido a su gran capacidad fermentadora de los productos cárnicos, *L. plantarum* se utiliza debido a su amplia distribución en la naturaleza y generalmente hace parte de la microbiota de productos cárnicos madurados y embutidos fermentados, con respecto a *L. curvatus* tiene la capacidad de producir péptidos antimicrobianos que son de gran ayuda para el control de microorganismos que afectan la inocuidad del producto.⁴¹

El género *Pediococcus* hace parte de las BAL, son cocos Gram positivos dispuestos en tétradas, son organismos homofermentativos de rápida fermentación debida a la producción de lactato con necesidades de temperaturas más altas en comparación con los *Lactobacillus*.⁴¹

2.7.2. Cocos Gram positivos catalasa positivos CGC+

En este grupo se encuentran los microorganismos que pertenecen a las familias Staphylococcaceae y Micrococcaceae, estos se pueden utilizar como cultivos iniciadores debido a su capacidad de reducir el nitrato a nitrito.¹⁷

Algunas especies como *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus equorum* y *Staphylococcus saprophyticus* se encuentran frecuentemente en los embutidos fermentados y gracias a su actividad nitrato reductasa, contribuye al desarrollo y estabilización del color del producto. Además, estos microorganismos tienen influencia sobre las propiedades organolépticas debido a su actividad lipolítica y proteolítica.¹⁷

Los CGC+ más comúnmente utilizados como cultivos iniciadores por su mejor competitividad en la fermentación cárnica son *S. xylosus* y *S. carnosus*. Estos microorganismos no presentan factores de virulencia en su genoma, aunque comparten un 53-55%, en el caso de *S. xylosus* y un 46-50% *S. carnosus* del genoma de *Staphylococcus* como *S. aureus* o *S. epidermidis*.¹⁷

Los *Staphylococcus* tienen la capacidad de metabolizar diferentes azúcares, además gracias a su capacidad de anaerobios facultativos pueden producir ácido láctico, acetato, piruvato y acetona. También presentan propiedades como la resistencia a diversas condiciones como altas concentraciones de sal, amplios rangos de temperatura y generalmente no son patógenos para la salud humana y animal, por lo anterior son los más utilizados como cultivos iniciadores o starter. ⁴¹

Estos microorganismos contribuyen sobre todo al desarrollo y estabilidad del color deseado en el producto por su actividad de nitrato reductasa, también al desarrollo de otras propiedades como textura, sabor mediadas por actividad enzimática de proteólisis y lipólisis.⁴¹

La combinación de condiciones como la acidez generada por las BAL, la reducción de nitratos dada sobre todo por los CGC+ y el uso de agentes reductores y sales son los que contribuyen al proceso de curado.

2.7.3. Mohos y levaduras

Los mohos y levaduras son utilizados principalmente con el fin de desarrollar sabor por medio de reacciones de fermentación de carbohidratos y oxidación del lactato, proteólisis, degradación de aminoácidos y lipólisis.⁴¹

Generalmente en los productos cárnicos durante el proceso de curado y maduración se produce una cobertura superficial de mohos y levaduras, los cuales cumplen la función de proporcionar propiedades de aspecto, color, olor y sabor muy atractivos para este tipo de productos.

Esto se logra a través de reacciones oxidativas y metabolismo de peróxidos. Esta población de mohos ofrece además protección frente al desarrollo de otros mohos patógenos y/o productores de antibióticos o micotoxinas.¹⁷

Los mohos más utilizados como cultivos iniciadores en la industria cárnica son especies del género *Penicillium*, especialmente *Penicillium nalgiovense* pues sus características son apropiadas para cumplir las funciones necesarias en el producto y además son de fácil implantación y su aspecto es atractivo.¹⁷

La principal especie de levadura empleada como cultivo iniciador es *Debaryomyces hansenii*, que tolera altas concentraciones de sal, no es fermentativa y no posee actividad nitrato reductasa, sin embargo, debido a su elevada demanda de oxígeno esta levadura puede contribuir a la formación del color gracias a la estabilidad de las condiciones anaeróbicas que se requieren para la reducción de nitrato.¹⁷

Especies	Propiedades funcionales y tecnológicas para la fermentación de la carne	Características organolépticas y de calidad
<i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Staphylococcus carnosus</i>	Rápida acidificación, desarrollo de aroma suave y color estable en el producto. El pH final puede ajustarse con la cantidad de azúcares fermentables añadidos a la mezcla de carne.	Preservación Firmeza Aroma
<i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i>	Generan una combinación de acidificación normal, un desarrollo positivo del aroma, y un buen color rojo estable en el producto. El pH final puede ajustarse con la cantidad de azúcares fermentables añadidos a la mezcla de carne.	Preservación Firmeza Aroma
<i>Staphylococcus xylosus</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i>	El proceso de acidificación se inicia rápidamente y da lugar a una disminución del pH del medio. <i>S. xylosus</i> da un color fuerte y estable y un sabor aromático.	Preservación Firmeza

Especies	Propiedades funcionales y tecnológicas para la fermentación de la carne	Características organolépticas y de calidad
<i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> y <i>Staphylococcus xylosus</i>	Fermentación rápida, distinto y muy buen gusto, buena formación de color y estabilidad. Debido a la producción de bacteriocina, tanto <i>L. curvatus</i> como <i>P. acidilactici</i> contribuyen a suprimir el crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> .	Preservación (pH y bacteriocina) Firmeza Aroma
<i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Staphylococcus carnosus</i>	Acidificación suave y desarrollo de aroma suave positivo, así como Color estable en el producto	Preservación Firmeza
<i>Lactobacillus pentosus</i> , <i>Staphylococcus carnosus</i>	Cultivos aromáticos con acidificación intermedia	Color Aroma Preservación
<i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i> y <i>Staphylococcus carnosus</i>	Proteólisis, Catabolismo de aminoácidos, Lipólisis, Propiedades antioxidantes: catalasa y Superóxido dismutasa, Reducción de nitratos	Color Aroma Preservación
<i>Staphylococcus equorum</i>	Desarrollo del sabor Reducción de Nitrato	Color Aroma Preservación
<i>Kocuria varians</i>	Reducción de Nitrato	Color Preservación

Tabla 5. Composición de algunos cultivos iniciadores comerciales utilizados para la fermentación de la carne.⁴¹

2.8. Cultivos utilizados en la elaboración del producto

2.8.1. *Staphylococcus xylosus*

Se definen como cocos Gram positivos agrupados en racimo, coagulasa negativos, se encuentran distribuidos como comensales en la piel de seres humanos, animales y en el ambiente.⁴³

Entre sus características bioquímicas o de identificación se encuentra que es normalmente sensible a la fleroxacina, meticilina, penicilina, teicoplanina, tetraciclina y eritromicina resistente y novobiocina. Es altamente activo bioquímicamente, produciendo ácido a partir de una amplia variedad de carbohidratos.⁴³

El ácido y el gas se producen a partir de galactosa, manosa, manitol, maltosa y lactosa. Las actividades caseinolíticas y de gelatinasa están normalmente presentes. *S. xylosus* es utilizada como agente de fermentación en productos cárnicos y lácteos. Su actividad nitrato reductasa contribuye al desarrollo del color rojo en la carne y a color naranja en la superficie de ciertos quesos debido también a la producción de pigmentos.⁴³

Se cree que *S. xylosus* tiene una influencia positiva en el sabor de los productos. Por lo anterior, las preparaciones comerciales de *S. xylosus* se usan en gran medida tanto en plantas industriales como en plantas de producción a pequeña escala, combinado con especies de especies de *Lactobacillus* y *Pediococcus*.⁴⁴

S. xylosus es capaz de resistir amplias temperaturas, altas cantidades de sal y la fermentación de varios azúcares permite que sea más rápido dicho proceso, la producción de aromas también es posible gracias a la producción de cetonas y alcoholes, la actividad proteolítica y lipolítica genera en el producto mejoras en la textura y es posible que en el sabor, gracias a sus características de resistencia y actividad metabólica esta bacteria puede permanecer predominante durante el proceso de fermentación en comparación con las BAL.⁴⁴

Species	Colony diameter (5 days \geq 5 mm)	Anaerobic growth in thioglycolate ^a	Lysostaphin (resistant to 50 μ g/ml)	Coagulase	Hemolysis (bovine)	Nitrate reduction	Phosphatase	Acid (aerobically) from												Novobiocin (resistant to 1.6 μ g/ml)		
								β -D-(-)Fructose	D(+)-Galactose	D(+)-Mannose	D(+)-Xylose and/or L(+)-Arabinose	D(-)-Ribose	Maltose	α -Lactose	Sucrose	D(+)-Trehalose	D(+)-Turannose	D(+)-Melezitose	D-Mannitol		Xylitol	
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	-	+	(+)	+	+	+	+	(+)	-	+	+	(+)	+	+	(+)	-	+	-	-	-v
<i>Staphylococcus sp.</i>	+	(\pm C)	-	+	(\pm)	+	+	+	+	+	-	+	(-)	+	+	+	(+, \pm)	-	(\pm , -)	-	-	-v
<i>Staphylococcus simulans</i>	(+)	+	-	-	\pm , -	+	(\pm)	+	-	(+)	-	v	- \pm	+	+	+	(\pm)	-	(+)	-	-	-v
<i>Staphylococcus xylosus</i>	+	v	-	-	(-)	(+)	(+)	+	+, \pm	+	+, \pm	v	(+)	v	+	+	(+, \pm)	-	+	(-)	-	+
<i>Staphylococcus colini</i>	(+)	v	-	-	(-, \pm)	-	(-)	+	-	v	-	-	(\pm ,+)	(-)	(-)	+	+	-	(+, \pm)	(+,-)	-	+
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	+	(+, \pm)	(+)	-	-	-	(-)	+	-	-	-	-	-	(+)	+	+	+	-	-	+	(+, \pm)	+
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	(+)	(\pm C)	+	-	(+)	(+)	(-)	+,-	v	-	-	(-)	+	-,+	+	+	v	-	+	-	-	-v
<i>Staphylococcus warneri</i>	-	(+)	+	-	- \pm	(-)	(-)	+	(-)	-	-	+	-	+ \pm	(-)	+	+	(-)	-	+	-	-v
<i>Staphylococcus hominis</i>	-	c	+	-	(-)	(+, \pm)	(-)	+	v	-	-	-	+	v	+	+	(+)	v	-	-	-	-v
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	+	+	-	- \pm	(+, \pm)	+	+	(+)	-	-	-	+	(+)	+	+	v	(-)	-	-	-	-v
<i>Staphylococcus capitis</i>	-	v	+	-	(-)	(+)	(-)	+	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-v

^a A single listed symbol denotes a type character frequency of 90 to 100%; parentheses around a symbol denote a type character frequency of 70 to 89%; two symbols are listed for a character when either type is in frequency below 70%, but together equal 80 to 100%. Symbols for characters (unless otherwise noted): +, positive; \pm , weak; -, negative; v, variable (+, \pm , and -).

^b Symbols for anaerobic growth: +, dense uniform; \pm , gradient from dense to light down tube; \pm C, gradient plus large individual colonies; c, small individual colonies to absence of visible growth; v, variable (+, \pm , and \pm C).

^c Symbol: -v, negative in our study, but could conceivably be variable with exposure to novobiocin in environment.

Figura 5. Características fenotípicas de las diferentes especies de *Staphylococcus* coagulasa negativos.⁴⁵

2.8.2. *Lactobacillus plantarum*

Bacteria perteneciente a las BAL, ampliamente distribuida en el ambiente, capaz de resistir diversas condiciones, se puede encontrar en lácteos, carne y muchas fermentaciones vegetales; además hace parte del tracto gastrointestinal humano.⁴⁶

L. plantarum tiene la capacidad de codificación para la fermentación de diversos azúcares, captación de péptidos y formación de la mayoría de los aminoácidos. Este microorganismo se localiza en alimentos de forma natural y cumple funciones conservadoras, también puede ser añadido como cultivo protector e iniciador por su capacidad homofermentativa, entre los carbohidratos que fermenta se encuentran la amigdalina, celobiosa, salicina, sacarosa, manitol y rafinosa, en ocasiones ramnosa. No fermenta inositol, sorbosa y glicerol.^{47, 48}

La temperatura óptima de crecimiento de *Lactobacillus plantarum* se da entre 15° a 45°C, resiste hasta un 4% de sales biliares y aproximadamente un 4% de NaCl. La capacidad inhibidora de *L. plantarum* se debe principalmente a condiciones como *disminución del pH*, producción de ácidos orgánicos, expresión de bacteriocinas y su capacidad de competencia con microorganismos alterantes.^{48, 49}

La bacteriocina mayormente producida por *L. plantarum* es la plantaricina la cual es un compuesto proteico que es capaz de reducir poblaciones bacterianas presentes en su habitat. Se ha encontrado beneficiosa para la salud y es usada como probiótico, además de contribuir con funciones inmunológicas ayuda al descenso de los niveles de colesterol.⁴⁹

Los *Pediococcus* y los *Lactobacillus* se encargan de controlar el proceso de fermentación y como resultado de esto generan una acidez media teniendo en cuenta la cantidad de azúcar fermentable. Además, es un cultivo protector inhibidor de bacterias como *Listeria monocytogenes*.⁵⁰

2.8.3. *Pediococcus pentosaceus*

Son bacterias en forma de cocos, Gram positivos, no móviles, no formadores de esporas, y se clasifican como BAL debido a que el producto final de su metabolismo es ácido láctico. Este microorganismo es anaerobio facultativo y su metabolismo es estrictamente fermentativo. *P. pentosaceus* puede crecer a 40°C, pero no a 50°C, entre pH 4,5 y 8,0, NaCl al 9-10%, hidroliza arginina, puede utilizar maltosa y algunas cepas producen una pseudo-catalasa.⁵¹

P. pentosaceus es industrialmente importante debido a su habilidad como un cultivo iniciador para fermentar los alimentos tales como carnes, verduras, quesos. Se pueden encontrar como microbiota normal en los materiales vegetales, queso curado, y una variedad de carnes procesadas.³⁹

Este microorganismo es preferido como cultivo iniciador y/o protector gracias a su capacidad homofermentativa en ciertos productos como embutidos fermentados al estilo americano pues son procesados a temperaturas más altas. La producción de pediocina PA-1 contribuye a la inhibición o disminución de poblaciones *L. monocytogenes* en productos cárnicos fermentados, sin embargo, esta bacteriocina no inhibe bacterias involucradas en el proceso de fermentación sobre todo los cocos Gram positivos catalasa positivos, CGC+.³⁹

Graham y McKay, 1985 han informado que *P. pentosaceus* contiene entre tres y cinco plásmidos los cuales expresan la capacidad de fermentar azúcares como rafinosa, melibiosa y sacarosa, además de la producción de bacteriocinas. Estos plásmidos pueden ser transferidos entre los géneros *Pediococcus* y *Enterococcus*, *Streptococcus* o *Lactococcus*.⁵¹

En la figura 6 se muestran las características generales de los cultivos iniciadores utilizados.

Bacteria species	<i>Staph. xylosus</i>	<i>Ped. pentosaceus</i>	<i>Lb. plantarum</i>
Temperature, °C: min./opt./max.	10/30/40	15/38/48	15/30/35
Salt tolerance: % salt-in-water	15	7	12
Fermentable sugars			
Fructose (a)	+	+	+
Galactose (b)	+	+	+
Glucose/ dextrose (c)	+	+	+
Lactose (b+c)	+	-	+
Maltose (c+c)	+	+	+
Sucrose/ saccharose (a+c)	+	+	-
Starch	-	-	-
Characteristics/ activities*	1, 3, 4, 5, 6, 8: +++	2, 7, 9: +	2, 7, 9: +++, 10

ND = not determind. *1. Facultative anaerobic, 2. Microaerophilic, 3. Nitrate reductase activity,

Figura 6. Características generales cultivos starter utilizados.⁵⁰

2.9. Aplicaciones de los cultivos iniciadores

Los cultivos iniciadores o starter son ampliamente utilizados en la industria alimentaria gracias a sus características metabólicas que contribuyen a la elaboración de cada producto, estas se resumen en la tabla 6.

Aplicaciones en la industria alimentaria	Microorganismos utilizados
Producción de alcohol para la industria vinícola y cervecera	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces uvarum</i> <i>Leuconostoc spp.</i>
Producción de pan ácido	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Cándida krusei</i> <i>Lactobacillus spp.</i> <i>Leuconostoc spp.</i> <i>Pediococcus spp.</i>
Producción de derivados lácteos	<i>Bacterias ácido lácticas</i> <i>Penicillium roqueforti</i> <i>Leuconostoc spp.</i> <i>Micrococcus varians</i> <i>Corynebacterium flabescens</i> <i>Staphylococcus xylosus,</i> <i>Debaryomyces hansenii</i>
Producción de embutidos	<i>Lactobacillus spp.</i> <i>Pediococcus spp.</i> <i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Candida deformans</i> <i>Penicillium nalgiovense</i> <i>Staphylococcus xylosus</i> <i>Staphylococcus carnosus</i>
Elaboración de vegetales fermentados	<i>Leuconostoc mesenteroides,</i> <i>Lactobacillus plantarum,</i> <i>Pediococcus rhamnosus</i> <i>Pediococcus cerevisiae</i>
Producción de vinagre	<i>Acetobacter spp.</i> <i>Acetomonas spp.</i> <i>Gluconobacter spp.</i>

Tabla 6. Aplicaciones de los cultivos starter.⁵²

3. DISEÑO METODOLOGICO

3.1. Universo, Población y muestra

Se seleccionaron 40 pernils de cordero procedentes de animales jóvenes machos de 4 meses de edad, de razas Dorper y Katahdin con cruces con razas criollas colombianas. Estas fueron proporcionadas por pequeños productores del departamento de Cundinamarca de los municipios de Guataqui en un 35%, 30% provenientes de Ricaurte y el 35% restante del municipio de Girardot.

El control utilizado fueron 10 piezas cárnicas sometidas al proceso de maduración con adición de sales curantes sin ningún tipo de aditivo adicional como generalmente son realizados los productos cárnicos crudo curados

3.2. Hipótesis, variables

3.2.1. Hipótesis

Los cultivos iniciadores tienen la capacidad de mejorar las características organolépticas de los productos cárnicos crudos curados y acelerar los procesos fisicoquímicos de este, lo anterior es producto del metabolismo bacteriano.

3.2.2. Variable independiente: pH, cultivos iniciadores, temperatura, concentración de sales, humo.

3.2.3. Variable dependiente: características organolépticas (color, sabor, olor y textura)

3.3 Técnicas y procedimientos

3.3.1 Selección y preparación de la materia prima

Las 40 piernas fueron almacenadas a -20 grados desde su llegada hasta el momento de inicio del experimento, la descongelación de la materia prima se realizó de manera controlada 24 horas a temperatura de $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en cuarto frío hasta que la temperatura interna de las piezas alcanzo los $5^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ para iniciar el proceso de elaboración del producto.

Una vez obtenidas estas condiciones se realizó la limpieza de las piernas, principalmente con la remoción de tejido conectivo, glandular y exceso de grasa en la cara interna de la pieza dejando la grasa contenida en la parte externa de la pierna.

Las piernas fueron clasificadas en 4 grupos diferentes teniendo en cuenta el peso.

Tratamiento 1 (control): 10 piernas con menor peso y sin uso de bacterias y sin humo

Tratamiento 2: 10 piernas con peso superior al tratamiento 1, sin bacterias y con humo.

Tratamiento 3: 10 Piernas con pesos superiores al tratamiento 2, sin humo y con bacterias

Tratamiento 4: 10 Piernas con pesos más altos al del tratamiento 3, con humo y con bacterias.

Se realizó la medición de pH en cada una de las piernas, mediante el uso del musculo semimembranoso Con pH metro de punzón.

3.3.2. Elaboración del producto cárnico

3.3.2.1. Masajeado de las piezas cárnicas

Teniendo en cuenta el peso se realizó los cálculos correspondientes de la cantidad de nitrito de sodio (NaNO_2) y nitrato de potasio (KNO_3) en proporciones de 150 ppm y 300ppm respectivamente. Se Adiciono el cloruro de sodio de grano fino en relación 10:1 con respecto al nitrito de sodio.

Se agregó 20 g de cultivo por cada 100kg de carne a las piezas que requerían la adición de cultivos bacterianos, además de agregar 2% de azúcar para la activación de las bacterias involucradas en este proceso. Se masajeo la pieza durante 10 minutos incorporando los agentes curantes a medida que se hace la operación del masajeado, comenzando desde los murillos y finalizando en la cadera, estas piezas se sometieron a temperatura de $4^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas.

Las bacterias utilizadas como cultivos iniciadores para la maduración del pernil de cordero fueron: *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* y *Staphylococcus xylosus*.

3.3.2.2 Salado de las piezas cárnicas

El salado de las unidades experimentales se realizó con cloruro de sodio de grano grueso para consumo humano, en una concentración del 97%, procedente de la Industria Salinera del Caribe, INDUSALCA. Para el procedimiento se emplearon contenedores plásticos con orificios para drenar con una capa de cloruro de sodio (aproximadamente 10 cm de profundidad) y sobre éste se dispuso la pieza con la cara interna hacia arriba para ser posteriormente cubiertas con otra capa de sal.

El tiempo empleado para la evaluación del salado fue de 0,7 días/Kg promedio donde las condiciones del salado fueron: temperaturas de $3\text{-}5^\circ\text{C}$ con una humedad relativa de 95%. Al finalizar el proceso de salado las piezas cárnicas fueron lavadas con agua potable y se dejaron escurrir a temperaturas de 3°C a 5°C en un tiempo no superior a 24 horas.

3.3.2.3. Proceso de post salado

Posterior al lavado de las piernas, éstas fueron colgadas en un cuarto frío con condiciones de temperatura y humedad relativa controladas las cuales se adecuaron gradualmente de temperaturas de 5°C a 12°C y de humedad de 90%-95% a 80% durante 15 días.

3.3.2.4. Secado y maduración

Cada tratamiento fue sometido al aumento gradual de la temperatura (de 5°C a 28°C ± 2°C) y disminución de la humedad relativa del 90 – 95 % hasta 75% por un tiempo de 3 meses de secado y maduración.

3.4. Análisis sensorial

Se realizó un panel no entrenado de 70 participantes con muestras del producto cárnico terminado y una muestra comercial (MC) mayormente consumida a nivel nacional proveniente de cerdo. El tamaño de las muestras dispuestas a los panelistas fue de 65 mm de longitud x 20 mm de ancho x 1,5 mm de espesor, las cuales fueron obtenidas mediante una tajadora, en este panel se evaluaron varios descriptores como olor, color, sabor y textura . En el anexo 1 se resume en diagrama la elaboración del producto cárnico.

3.5. Determinación de microorganismos contaminantes, análisis de control de calidad

3.5.1. Recolección de muestras

La recolección de muestras se llevó a cabo en tres etapas diferentes de proceso de elaboración del producto las cuales fueron recepción de materia prima, postsalado y maduración donde se seleccionaron 2 piezas cárnicas de cada tratamiento al azar para análisis microbiológico y fisicoquímico en cada una de las etapas. Las muestras se toman sin cauterización previa, se obtuvieron 500 gramos de la pieza cárnica los cuales fueron distribuidos en dos partes iguales, 250 gramos para análisis microbiológico y 250 gramos para análisis fisicoquímico.

El transporte de las muestras se hizo a una temperatura de 0 °C a 4 °C evitando a la exposición a la luz solar teniendo en cuenta que estas muestras debían ser analizadas en un lapso máximo de 5 días.

3.5.2. Inoculación de muestras

A partir de los 250 g recolectados para el análisis microbiológico se tomaron 11 gr de producto homogenizados en 90 ml agua peptonada tamponada durante 2 min aproximadamente para el análisis de *mesófilos*, *Coliformes*, recuento de *Staphylococcus aureus* y *Clostridium* spp. Para el análisis de *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes*, se usaron 25 gramos homogenizados en 225 ml de agua peptonada. Posteriormente se realizaron diluciones en base 10 para el análisis de calidad microbiológica teniendo en cuenta el método utilizado para cada microorganismo (Norma técnica colombiana).

3.6. Recuento de cultivos iniciadores

El recuento de los cultivos iniciadores se realizó en dos etapas diferentes de la elaboración del producto cárnico, postsalado y final de la maduración, se tomaron 2 piezas cárnicas al azar de cada uno de los 4 tratamientos, se homogenizo 11 gramos de la muestra en 90 ml de agua peptonada.

Se realizaron diluciones en base 10 hasta 10^{-9} , posterior a este proceso se inoculo 1 ml de cada dilución por método de profundidad en agar salado manitol para la detección de *Staphylococcus xylosus* y en agar MRS para la determinación de bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus pentosaceus* en un periodo de incubación de 24-72 horas a 37 °C en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis respectivamente.

Se observaron las colonias características principalmente de *Staphylococcus xylosus* y Posteriormente se realizó el recuento en placa de estas. Por último, se realizó la confirmación de dichos microorganismos mediante BBL CRYSTAL

4. RESULTADOS

4.1. Análisis de microorganismos indicadores de calidad

Se realizó la identificación de microorganismos indicadores de calidad en productos cárnicos de acuerdo con la NTC 1325 durante todo el proceso de elaboración del jamón crudo curado. Se analizaron los siguientes microorganismos:

4.1.1. *Staphylococcus coagulasa positiva (S. aureus)*

Realizado mediante la NTC 4779 (ver anexo 2). El crecimiento de colonias características con doble halo en el agar Baird Parker no se evidencio en ninguna de las etapas, sin embargo, se realizó confirmación con la prueba de coagulasa en donde todas fueron negativas y por lo tanto el recuento total fue <100 UFC/gr. (ver figuras 7 y 8)



Figura 7. Recuento en placa de *Staphylococcus coagulasa positiva*. Fotos autores

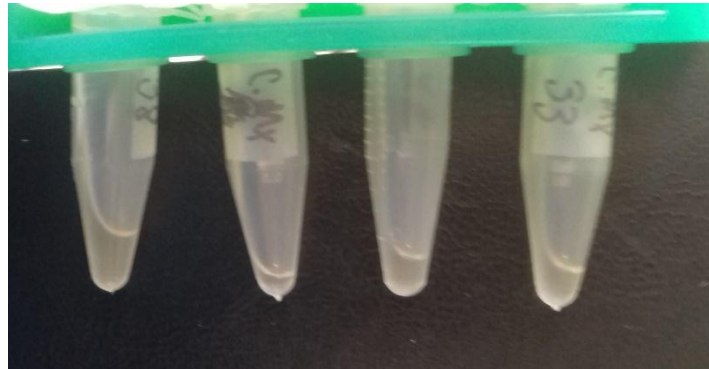


Figura 8. Prueba confirmatoria coagulasa

4.1.2. NMP *Coliformes* totales y fecales

Se realizó mediante la NTC 4516 (ver anexo 3). Se hizo la determinación en caldo bilis verde brillante con campana de Durham para observar la presencia de CO₂ y turbidez en el medio. En la etapa de materia prima se encontraron 80 NMP/gr de *coliformes* totales y 9.7 NMP/gr para *coliformes fecales* a diferencia de las dos etapas posteriores donde el NMP de *coliformes totales* y fecales se mantuvo <3 NMP/gr. (Ver figuras 9 y 10)



Figura 9. *Coliformes* totales y fecales en la etapa 0 (materia prima)

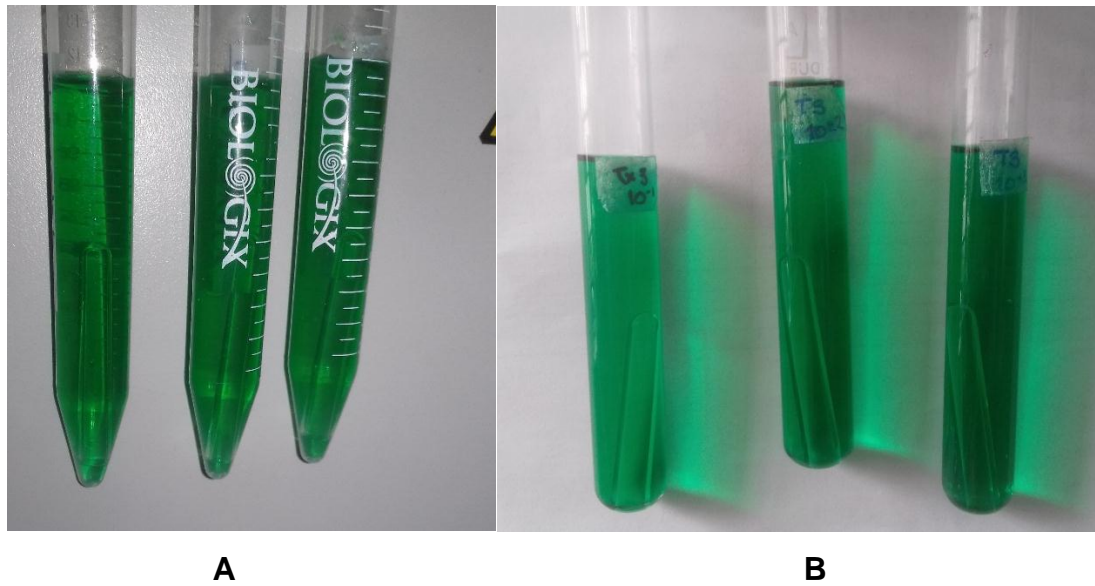


Figura 10. NMP *Coliformes*. **A.** etapa de post-salado; **B.** etapa de maduración

4.1.3. Recuento de *Mesófilos aerobios*

Se realizó mediante NTC 4519 (ver anexo 4). Se realizaron recuentos en agar Plate Count por método de profundidad, en las tres etapas estudiadas se encontraron recuentos >300 UFC/gr. Es importante tener en cuenta que para este tipo de producto no existen límites microbianos permisibles de acuerdo con la NTC 1325 (véase la tabla 2 y figuras 11 ,12 y 13)

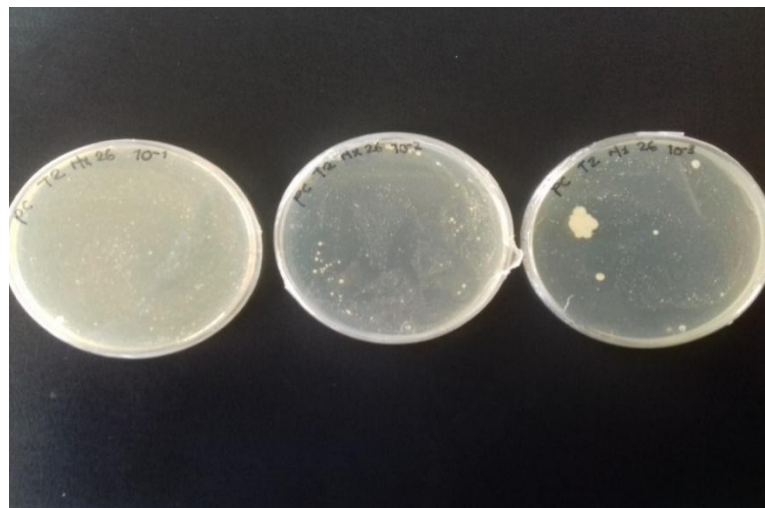


Figura 11. Recuento de mesofilos en agar plate count en la etapa 0 (materia prima)

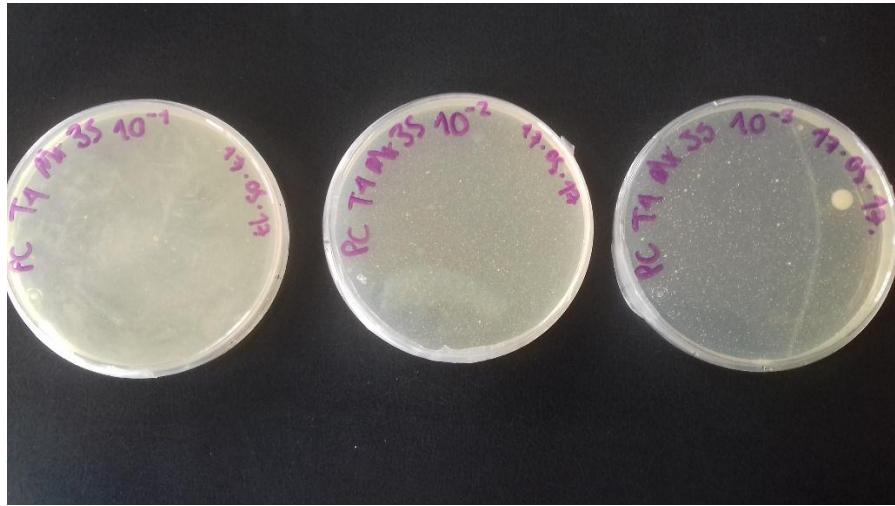


Figura 12. Recuento de *mesofilos* en agar plate count en la etapa de post-salado

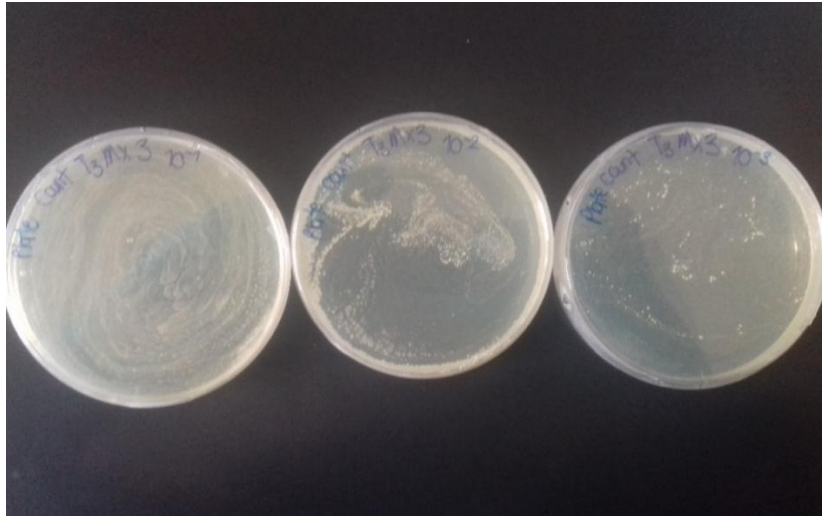


Figura 13. Recuento de *mesofilos* en agar plate count en la etapa de maduración

4.1.4. Detección de *Salmonella* spp

Se realizó mediante la NTC 4574 (ver anexo 5). El crecimiento de *Salmonella* spp en los agares selectivos como XLD y SB no se evidencio en ninguna de las etapas de la elaboración del producto cárnico cumpliendo con la norma establecida. Ver figuras 14, 15 y 16.

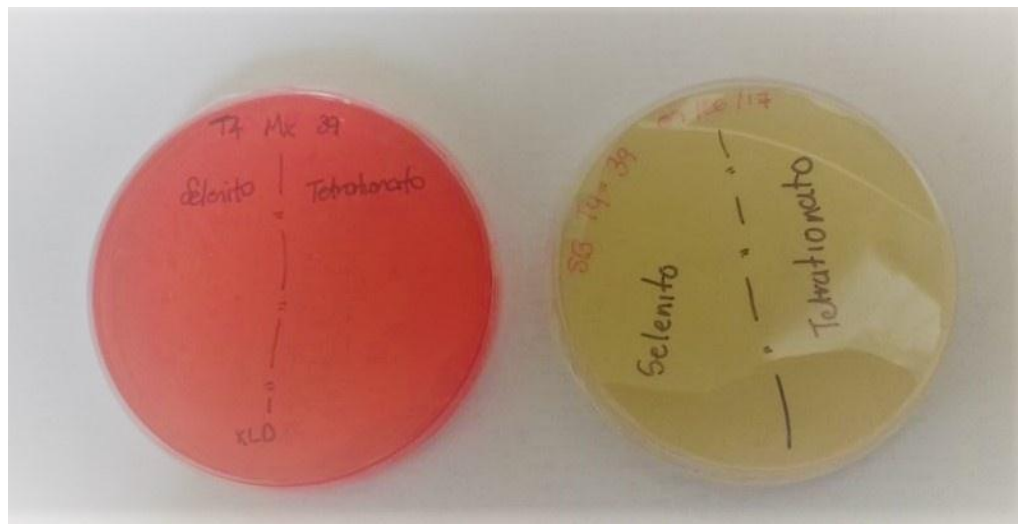


Figura 14. Detección de *Salmonella* spp. Agar XLD y SB en la etapa de materia prima.



Figura 15. Detección de *Salmonella* spp. Agar XLD en la etapa de Post-salado.

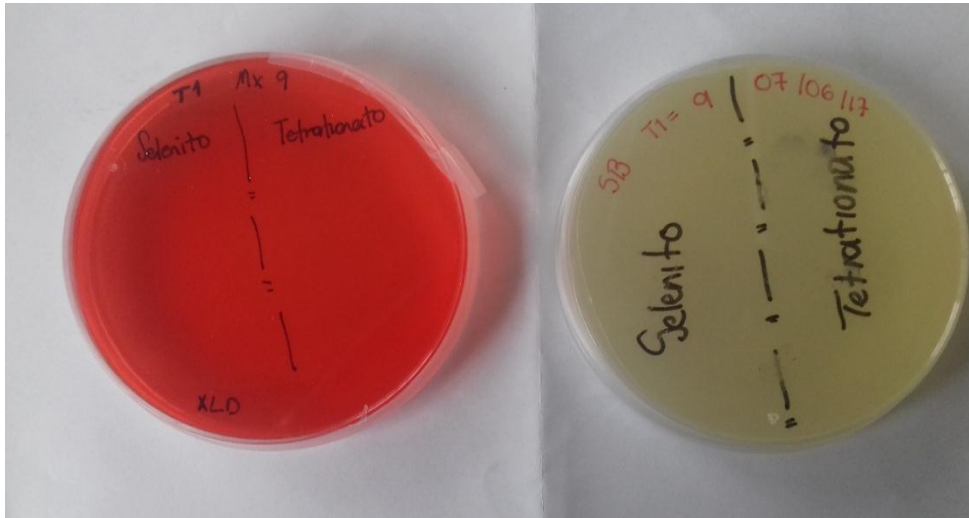


Figura 16. Detección de *Salmonella* spp. Agar XLD y SB en la etapa de maduración.

4.1.5. *Listeria monocytogenes*

Se hizo la determinación teniendo en cuenta la NTC 4666 con método modificado en CHROMagar™ *Listeria*, previo enriquecimiento en caldo Fraser (ver anexo 6) donde las colonias típicas debían ser azules con halo, en ninguna de las etapas se detectó la presencia de *Listeria monocytogenes*. Ver figuras 17 y 18



Figura 17. Control *Listeria monocytogenes* en CHROMagar™

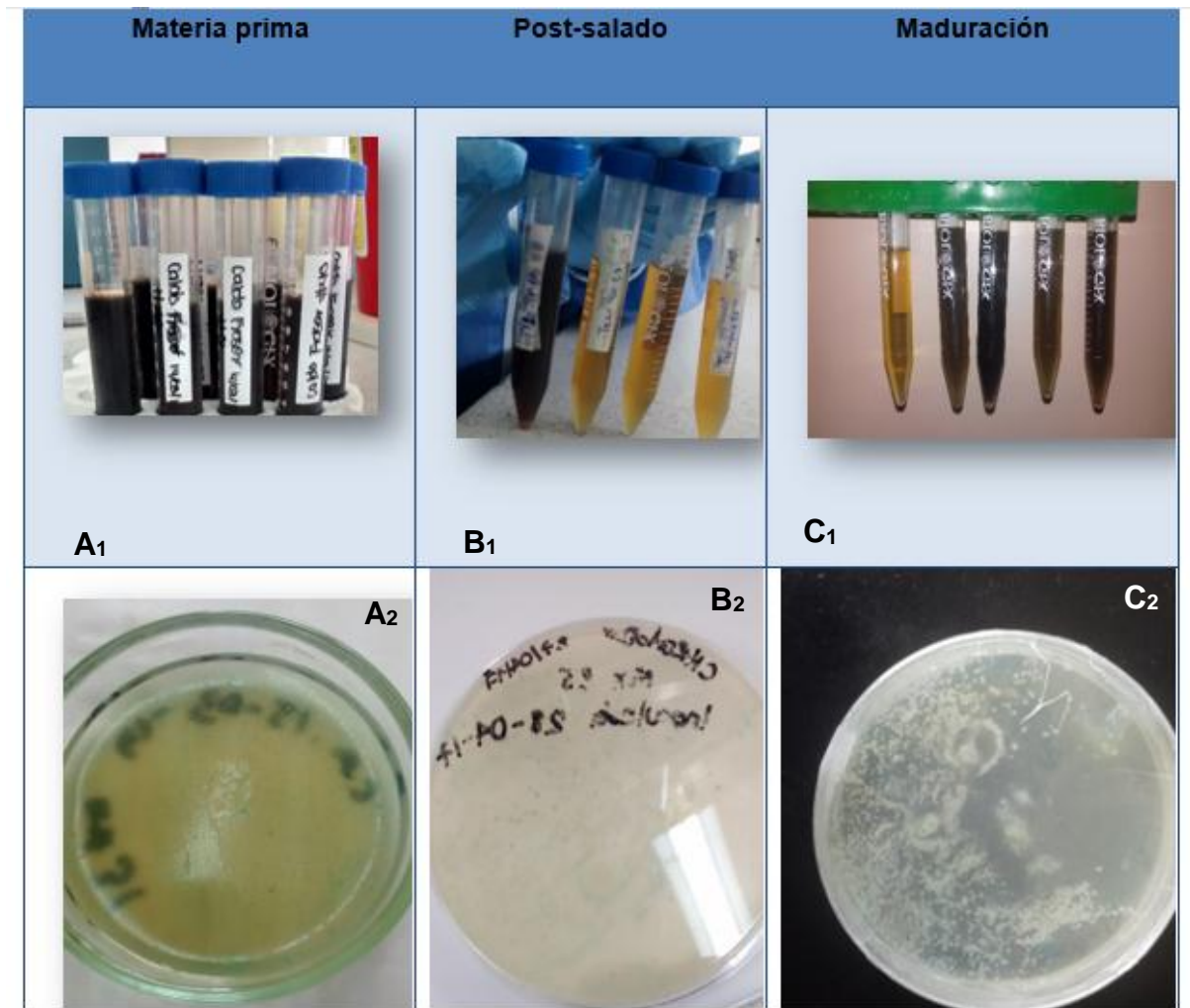


Figura 18. Detección de *Listeria monocytogenes*. **A₁**. Caldo fraser, materia prima; **A₂**. CHROMagar™, materia prima; **B₁**. Caldo fraser, post-salado; **B₂**. CHROMagar™, post-salado; **C₁** Caldo fraser, maduración ; **C₂**. CHROMagar™, maduración.

4.1.6. Esporas *Clostridium* sulfito reductor

El recuento en placa se hizo mediante la NTC 4834 (ver anexo 7), el recuento de esporas se realizo con la norma INVIMA 10 (ver anexo 8). En las etapas analizadas no hubo crecimiento de colonias típicas, por lo anterior el recuento fue <10 UFC/gr cumpliendo con lo estipulado en la normatividad colombiana. Ver figuras 19, 20 y 21.

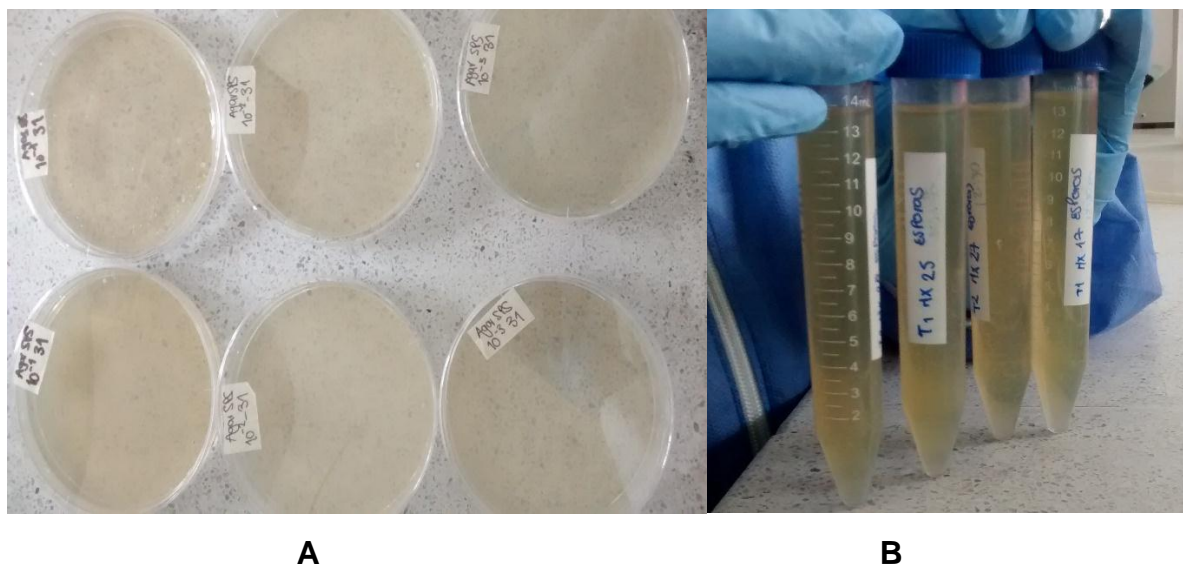


Figura 19. Recuento *Clostridium* sulfito reductor, etapa materia prima. **A.** Recuento en placa agar SPS; **B.** Esporas *Clostridium* sulfito reductor agar SPS, choque termico.

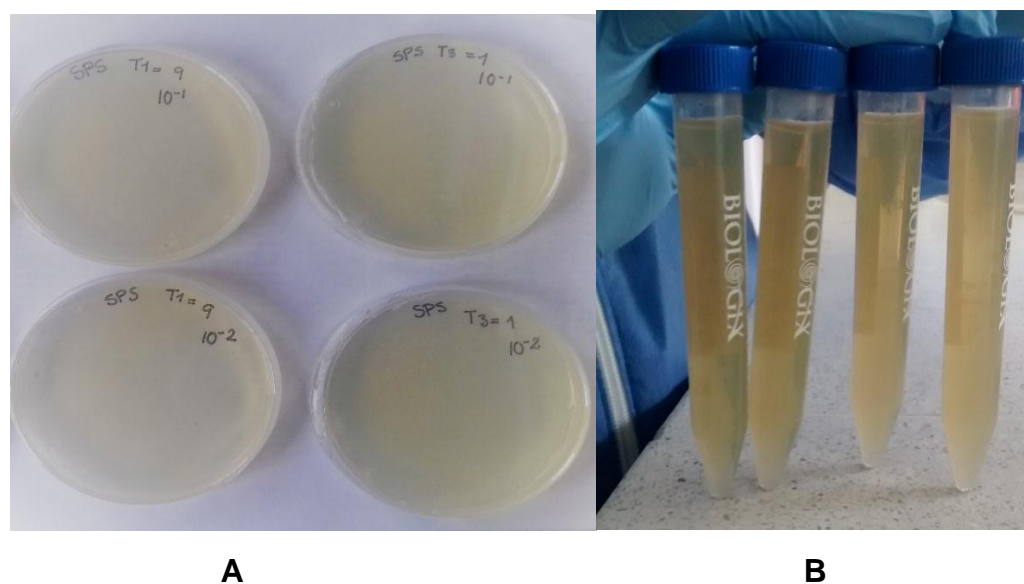


Figura 20. Recuento *Clostridium* sulfito reductor, etapa post-salado. **A.** Recuento en placa agar SPS; **B.** esporas *Clostridium* sulfito reductor agar SPS, choque termico.

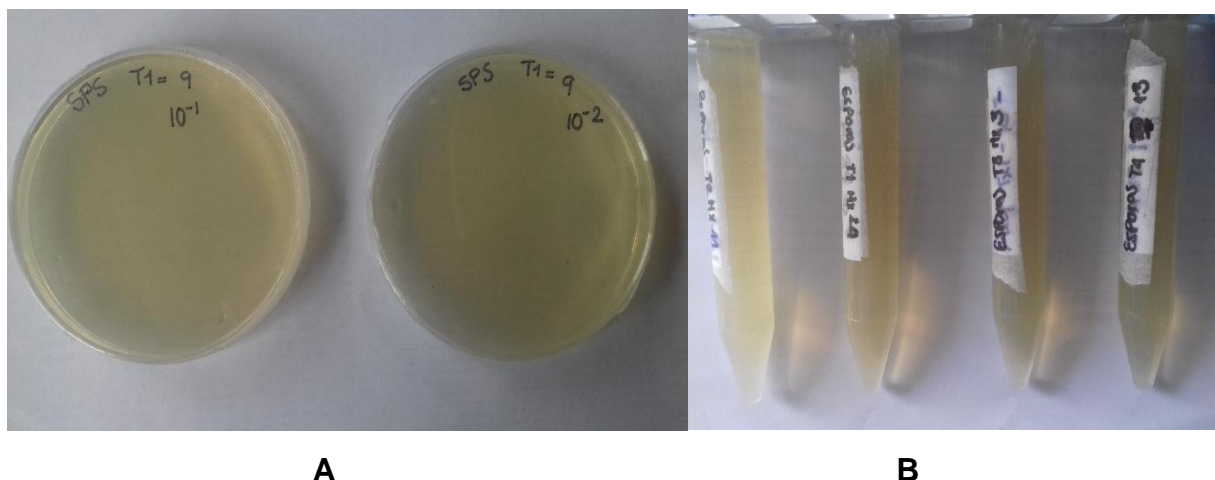


Figura 21. Recuento *Clostridium* sulfito reductor, etapa maduración. **A.** Recuento en placa agar SPS; **B.** esporas *Clostridium* sulfito reductor agar SPS, choque termico.

En la tabla 7 se muestra el reporte del análisis microbiológico de calidad en las 3 etapas del proceso.

ANÁLISIS MICROORGANISMOS INDICADORES DE CALIDAD	ETAPA 1 (MATERIA PRIMA)	ETAPA 2 (POST-SALADO)				ETAPA 3 (MADURACIÓN)				LIMITES PERMISIBLES
		T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	
NMP Coliformes totales /g o ml	80 NMP Coliformes totales/g	<3 NMP Coliformes totales/g				<3 NMP Coliformes totales/g				<10 – 200
NMP Coliformes fecales /g o ml	9.7 NMP Coliformes fecales/g	<3 NMP Coliformes fecales/g				<3 NMP Coliformes fecales/g				<10 – /
Recuento de mesófilos aerobios UFC/g o ml	>300 UFC/g	>300 UFC/g				>300 UFC/g				/
Estafilococo coagulasa (+) UFC/g o ml	<100 UFC/g	<100 UFC/g				<100 UFC/g				<100
Detección de Salmonella spp. en 25 g de muestra	Ausencia	Ausencia				Ausencia				Ausencia
Detección de Listeria monocytogenes en 25g de muestra	Ausencia	Ausencia				Ausencia				Ausencia
Esporas Clostridium sulfito reductor	<10	<10				<10				<10 – 100

Tabla 7. Reporte análisis microbiológico. Fuente, Autores

4.2. Recuento de cultivos iniciadores

4.2.1. Recuento bacterias ácido lácticas

Se realizó el recuento de bacterias ácido lácticas teniendo en cuenta la NTC 5034 (ver anexo 9) por método de profundidad en agar MRS para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus pentosaceus* las cuales fueron las BAL añadidas al producto. Ver figuras 22 y 23.

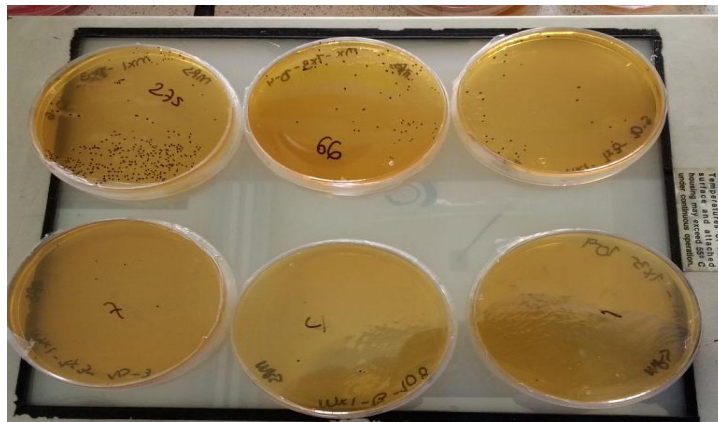


Figura 22. Recuento en placa bacterias ácido lácticas

A continuación se muestra la grafica de crecimiento de las bacterias acidolácticas en las etapas de post-salado y maduración

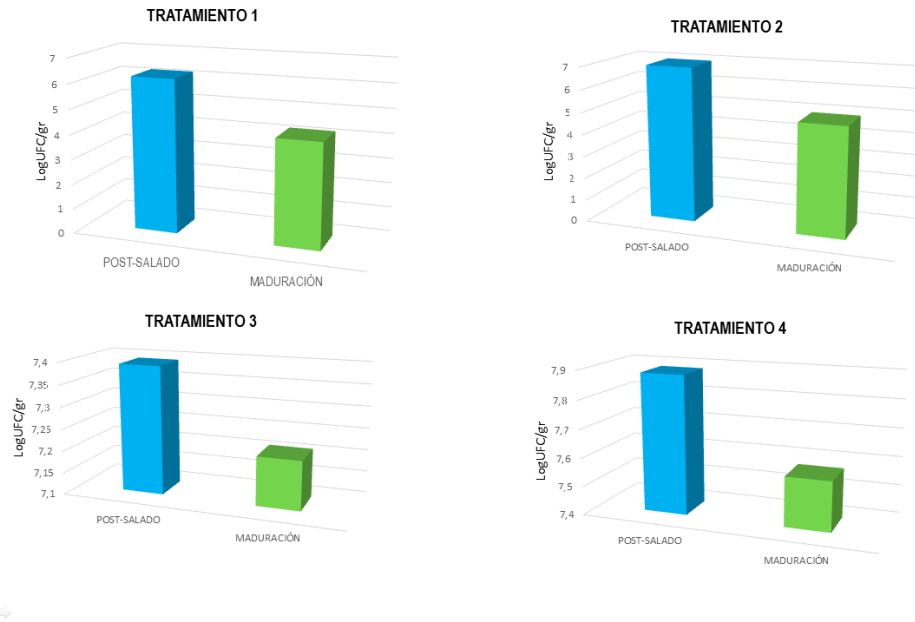


Figura 23. Crecimiento de BAL en dos etapas del proceso de elaboración del producto carnico.

Resultados obtenidos de los promedios del crecimiento bacteriano en cada uno de los cuatro tratamientos.

En cada etapa se analizaron dos piezas carnicas al azar por cada tratamiento para obtener una muestra representativa de cada lote, el crecimiento es evaluado a partir de UFC/g entre 15-300 por duplicado.

4.2.2. Recuento de *Staphylococcus xylosus*

Se realizó el recuento de colonias características en agar salado manitol (ver anexo 9) por método de profundidad -para el crecimiento de *Staphylococcus xylosus* utilizado como cultivo iniciador para la maduración del producto carnico. Ver figuras 24 y 25

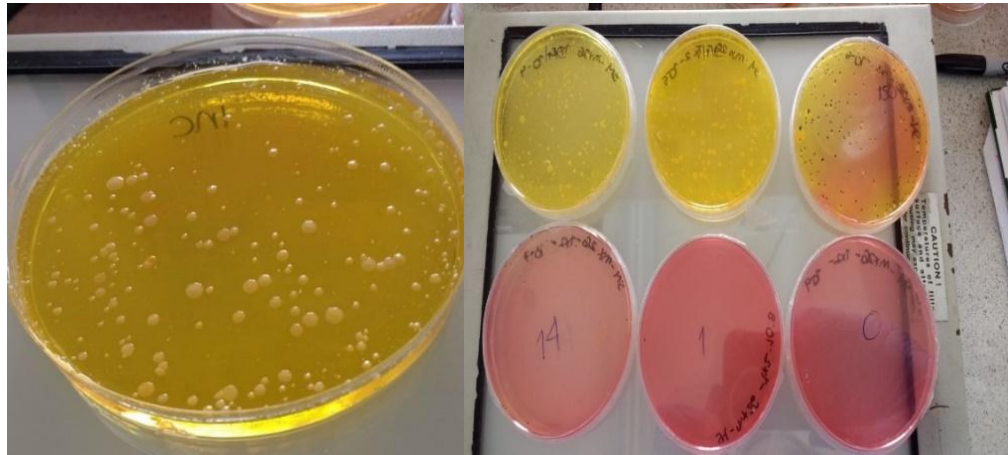


Figura 24. Recuento en placa *Staphylococcus xylosus*

A continuación se muestra la grafica de crecimiento de *Staphylococcus xylosus* en las etapas de post-salado y maduración

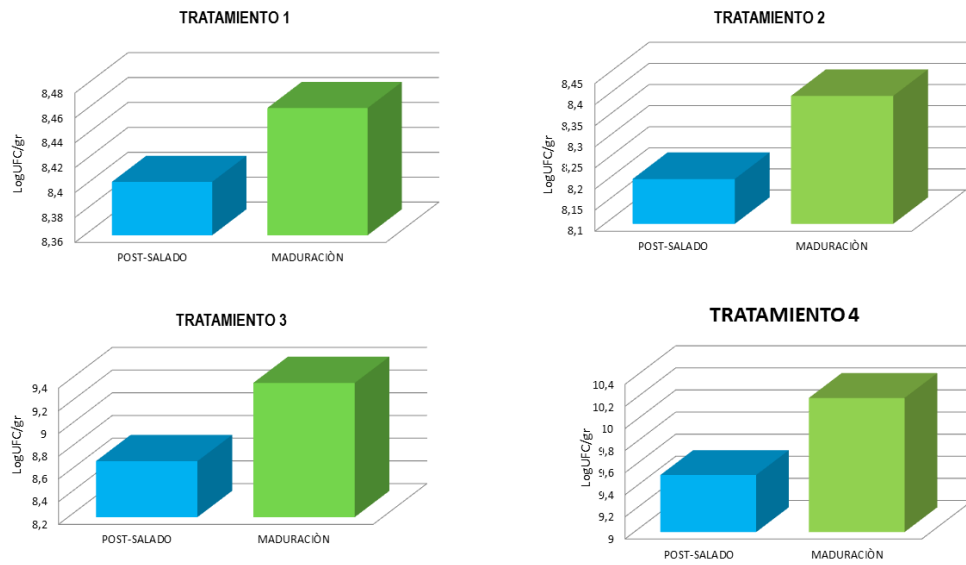


Figura 25. Crecimiento de *Staphylococcus xylosus* en dos etapas del proceso de elaboración del producto carnico.

Resultados obtenidos de los promedios del crecimiento bacteriano en cada uno de los cuatro tratamientos. En cada etapa se analizaron dos piezas carnicas al azar por cada tratamiento para obtener una muestra significativa de cada lote, el crecimiento es evaluado a partir de UFC/g entre 30-300 por duplicado.

Nota: Los recuentos totales de las gráficas anteriores expresados en Log UFC/g se encuentran en el anexo 10.

4.2.3. Confirmación de *Staphylococcus xylosus* por metodo BBL crystal

En todos los tratamientos se identificó *Staphylococcus xylosus* con un porcentaje de concordancia del 86,73% y 97, 9% para los tratamientos 1 y 2 respectivamente y del 99,9% para los tratamientos 3 y 4.

The screenshot shows the 'Estadísticas' (Statistics) window of the BBL Crystal software. It displays a table with three rows of bacterial identifications. The first row is for *Staphylococcus xylosus*, the second for *Staphylococcus equorum*, and the third for *Staphylococcus saprophyticus*. Each row includes a 'Validez del biotipo' (Biotype Validity) and a 'Confianza' (Confidence) value. Below the table, there is a section for 'Reacciones atípicas para este organismo en este sistema:' (Atypical reactions for this organism in this system), which lists 'FHO 4MU-Phosphate Neg. (-)' under the heading 'Staphylococcus xylosus'. At the bottom, there is a note: 'Informe de ID BBL Crystal basado en estas estadísticas.'

	Validez del biotipo	Confianza
1 Staphylococcus xylosus	6	> 0.9999
2 Staphylococcus equorum	11,181,401	< 0.0001
3 Staphylococcus saprophyticus	3,005,944,068	< 0.0001

Reacciones atípicas para este organismo en este sistema:

Staphylococcus xylosus

FHO 4MU-Phosphate Neg. (-)

Informe de ID BBL Crystal basado en estas estadísticas.

Figura 26. Identificación de *Staphylococcus xylosus* mediante el método BBL crystal

4.3. Análisis fisicoquímico

Los parámetros fisicoquímicos analizados para esta investigación, los cuales se correlacionan directamente con el crecimiento bacteriano fueron:

4.3.1. pH (potencial de hidrogeno)

La toma de pH se realizó semanalmente durante el proceso de elaboración del producto cárnico. Los resultados fueron obtenidos de los promedios del pH en cada uno de los cuatro tratamientos los cuales se muestran en la figura 27

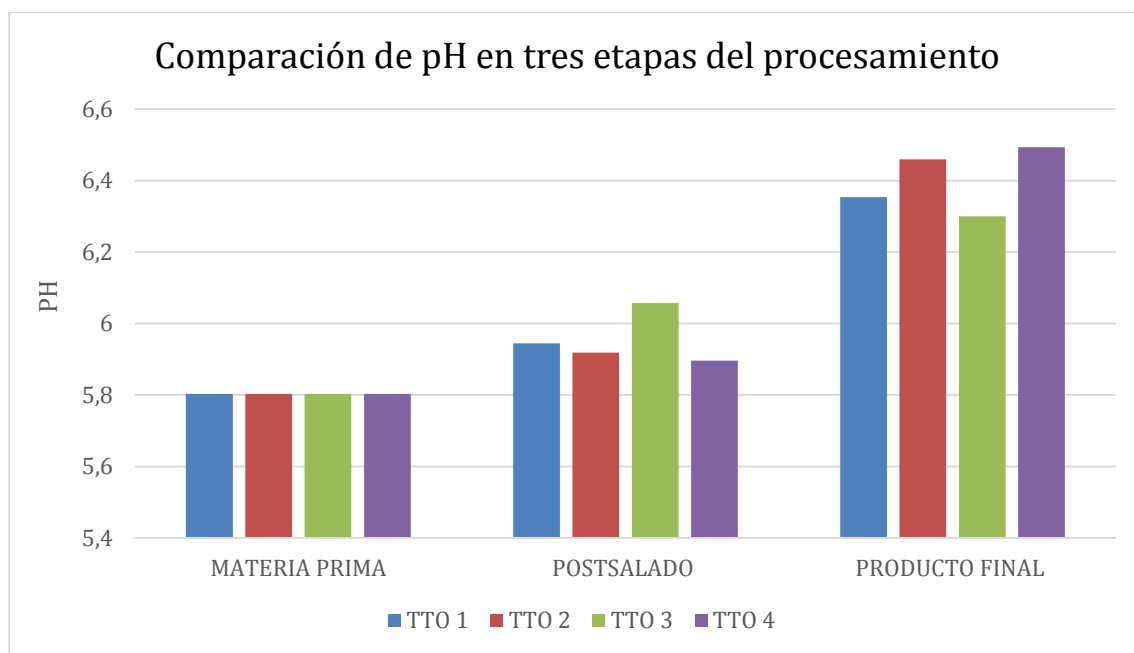


Figura 27. Comparación de pH entre las etapas de materia prima, post-salado y maduración.

Los promedios de pH se realizaron de cada uno de los tratamientos. (Ver anexo 11). Los resultados obtenidos muestran una variación notable desde la etapa de materia prima hasta el final de la maduración o producto final.

Nota: Es importante resaltar que en la materia prima las piezas no habían sido sometidas a ningún tipo de tratamiento por lo tanto el promedio se realizó de la población total.

4.3.2. Análisis de la actividad de agua

La actividad de agua se midió en tres etapas (materia prima, post-salado y maduración). Se realizó el promedio de los datos obtenidos en cada uno de los tratamientos (ver anexo 12), para este análisis también se tomaron 2 muestras de cada tratamiento en cada una de las etapas.

En la figura 28 se observa la actividad de agua en cada uno de los tratamientos y etapas del proceso.

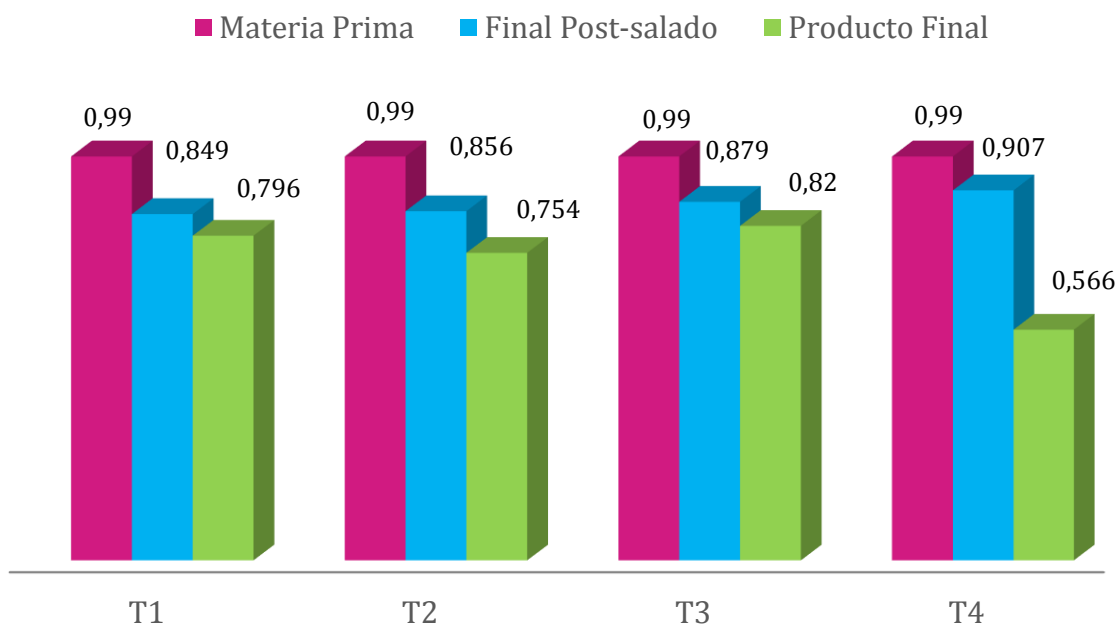


Figura 28. Actividad de agua promedio en tres etapas de la elaboración del producto cárnico.

Teniendo en cuenta la gráfica se puede observar que la cantidad de agua retenida en el producto en las etapas de materia prima y post-salado no tuvo variación alguna, a diferencia del final de la maduración donde la actividad de agua tuvo una disminución de sales.

4.3.3. Medición de cloruro de sodio

La medición de cloruro de sodio se tomó en cada una de las etapas antes mencionadas y las muestras fueron tomadas de cada uno de los tratamientos y por lo tanto los resultados obtenidos fueron promediados (ver anexo 13, figura 29).

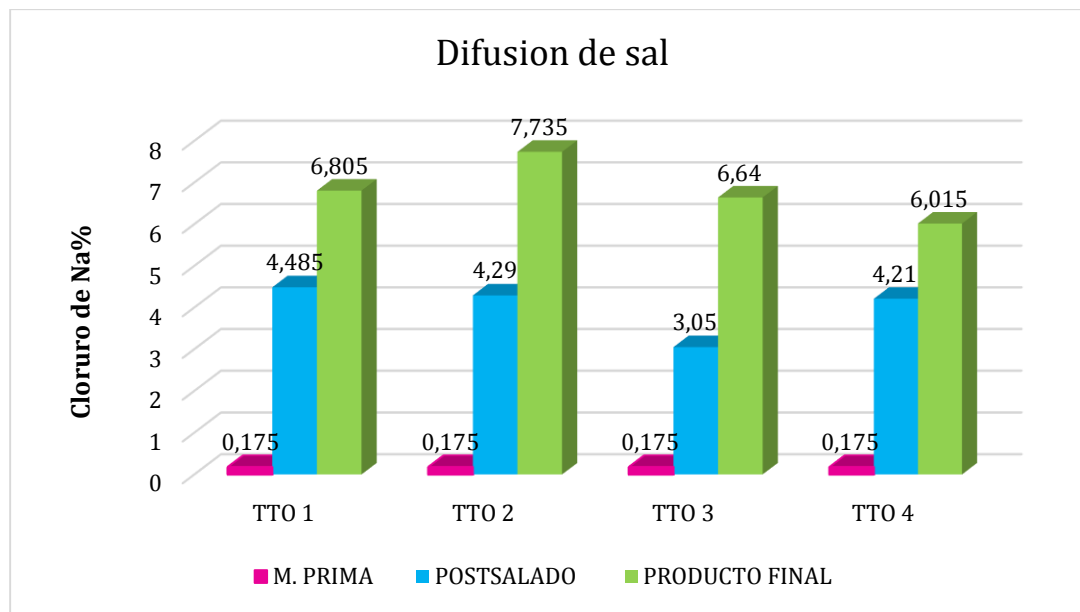


Figura 29. Determinación de la concentración de cloruro de sodio.

El análisis de la cantidad de sal durante cada etapa evaluada mostró un comportamiento de ganancia de sal en las piezas cárnicas desde la materia prima hasta el producto final.

4.4. Análisis sensorial

El análisis sensorial de percepción del consumidor se hizo con la participación de 70 personas con la evaluación de las características organolépticas del producto y cuál fue el producto de mayor preferencia.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 30 y 31

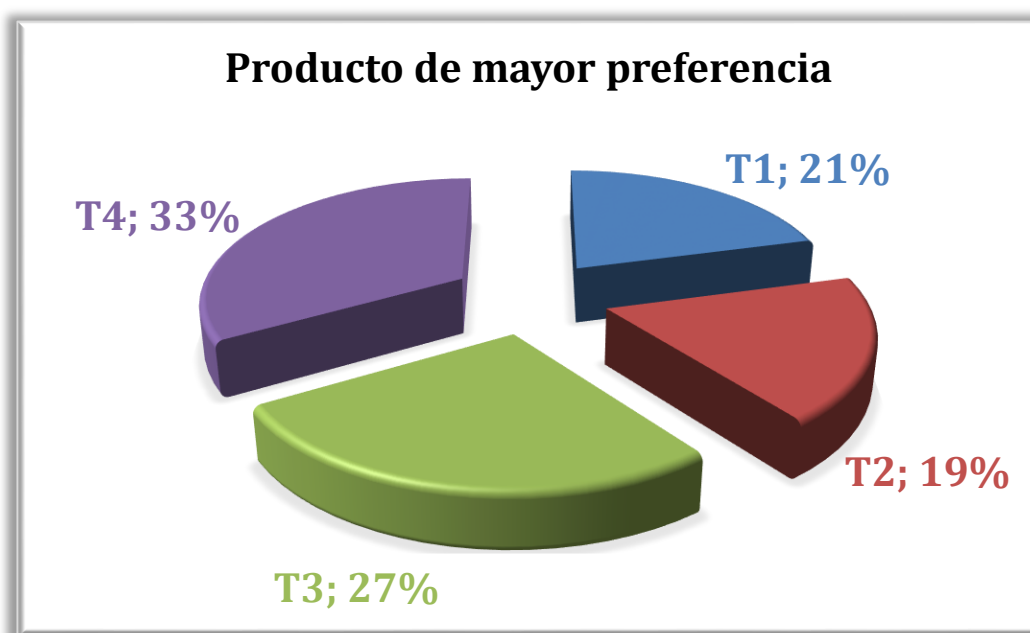


Figura 30. Percepción del consumidor (producto de mayor preferencia).

Los resultados obtenidos muestran mayor afinidad por los productos de los tratamientos 3 y 4 los cuales contenían los cultivos iniciadores.

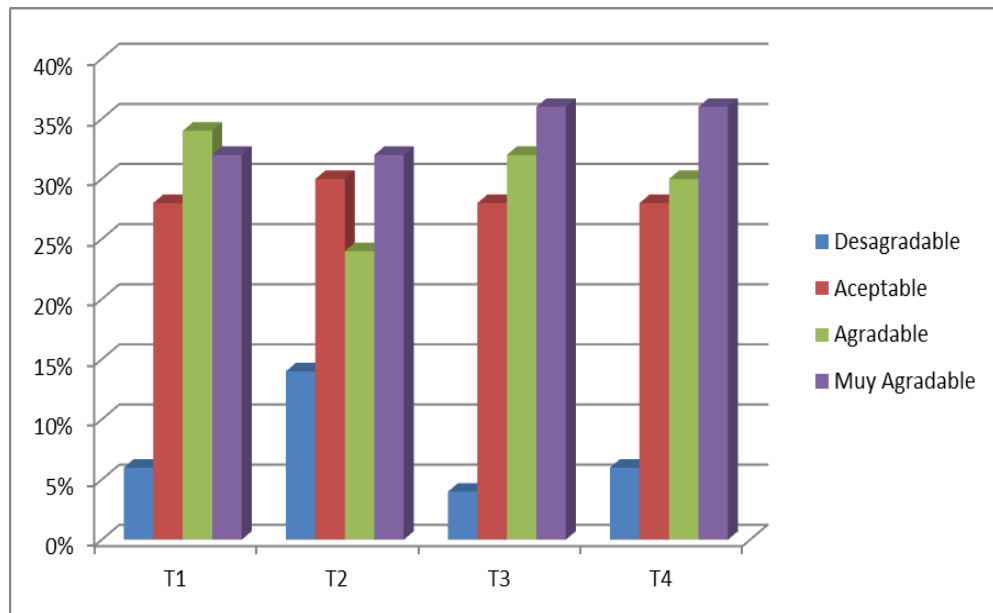


Figura 31. Percepción del consumidor (sabor del producto consumido).

Los resultados obtenidos demuestran la acción de los cultivos iniciadores en el sabor del producto ya que los consumidores califican los tratamientos 3 y 4 como los más agradables.

4.5. Producto final

Se obtuvieron 4 productos con diferentes características, cada uno de ellos cumplió los requerimientos de calidad microbiológica exigidos en la normatividad colombiana.

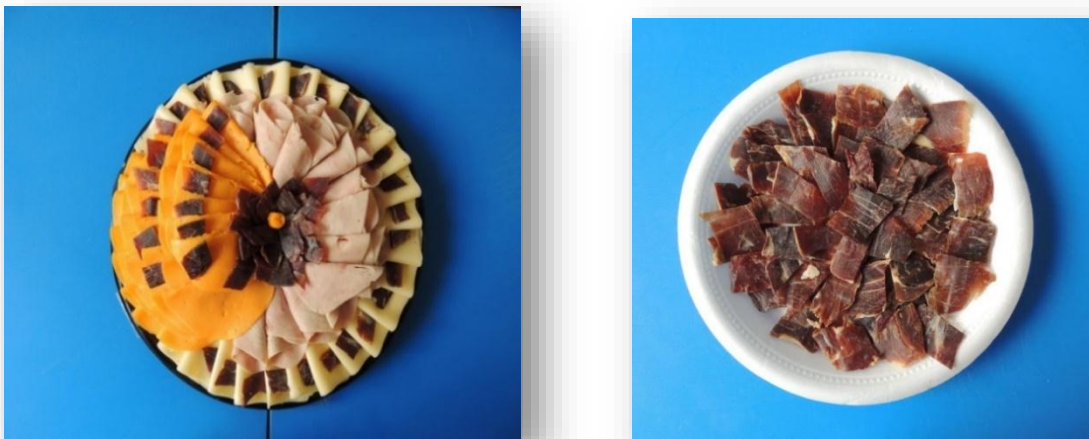


Figura 32. Producto final presentado para el análisis sensorial. Fuente, autores.

5. DISCUSIÓN

Los productos cárnicos crudo curados en la industria colombiana generalmente son elaborados a partir de perniles de cerdo, estos son sometidos a procesos de maduración mediante la adición de sales principalmente, de acuerdo con protocolos establecidos.⁵²

En este trabajo se realizó la elaboración de un producto cárnico crudo curado, pero a diferencia de los productos normalmente comercializados este se hizo a partir de piernas de ovino, además en 2 de los lotes producidos se agregó cultivos iniciadores (uno de ellos con adición de humo líquido) con el fin de mejorar las características organolépticas del producto. Los dos lotes restantes realizaron su proceso de maduración sin adición de bacterias, pero uno de ellos fue sometido a la adición de humo líquido.

Es importante resaltar que este es uno de los primeros productos que se elaboran en Colombia, teniendo en cuenta que la materia prima utilizada no es muy reconocida para el consumo de la población, Además en el proceso de transformación de la carne se implementó el uso de cultivos iniciadores con el fin de mejorar las características organolépticas y la calidad microbiana del mismo. Estos cultivos son normalmente utilizados en embutidos cárnicos fermentados mientras que la mayoría de los productos cárnicos crudos curados llevan un proceso artesanal sin la utilización de dichos microorganismos.

Los resultados obtenidos en el análisis sensorial del panel de percepción al consumidor demostraron una notable preferencia por los productos de los lotes 3 y 4 que eran los que tenían cultivos iniciadores, con un 33% el lote numero 4 fue el de mayor preferencia por el público debido a sus características organolépticas generadas a partir del crecimiento bacteriano dado por los cultivos iniciadores y la adición de humo líquido.

Teniendo en cuenta el análisis sensorial de percepción al consumidor se evidencio que los productos de mayor preferencia fueron los sometidos a los tratamientos 3 y 4, lo anterior demuestra la acción de los cultivos iniciadores sobre las características organolépticas del producto. La combinación de los microorganismos utilizados en la maduración del producto es la adecuada gracias a la capacidad metabólica que cada uno de ellos ejerce

Frederic Leroy, 2005, afirmo que los cultivos iniciadores contribuían con las mejoras en las características organolépticas y ayudaban al proceso de inhibición de microorganismos patógenos en los embutidos, adicional a estos beneficios también encontró que contribuían con la inhibición de cancerígenos, reducían los niveles de grasa corporal, aumentan la función del sistema inmunológico, entre otros ⁵³

La carne de cordero es un producto poco conocido y comercializado en Colombia, un estudio económico de la universidad ICESI de Santiago de Cali en 2015 revela la estructura de la cadena cárnica ovina colombiana y las falencias a las que se enfrenta este sector debidas principalmente al desconocimiento de la población frente a este tipo de productos. Sin embargo, en el estudio de campo realizado se evidencio una aceptación del producto con respecto al sabor y demás propiedades de la carne de cordero.⁵⁴

Teniendo en cuenta lo anterior es importante intensificar los estudios encaminados a la producción de carne de cordero en el país con el fin de expandir el conocimiento de sus propiedades y a su vez la oportunidad de comercializar este alimento y sus productos derivados, en este caso el jamón crudo curado de cordero. Los resultados obtenidos muestran una gran aceptación para el consumidor sobre todo los productos con la adición de cultivos iniciadores, lo cual incentiva a la producción de carne de este tipo en Colombia y con ello la industria cárnica colombiana tendría una variedad más amplia en sus productos y además sería una nueva forma de alimentación para el consumidor.

Existe otro producto cárnico crudo curado producido generalmente en España elaborado a partir de piezas cárnicas de ganado vacuno (babilla, tapa y contra) denominado cecina, este es sometido al mismo proceso del jamón serrano y el producto realizado en este proyecto.

Molinero Sastre en el 2009 realizó un estudio en cecina de león que es un producto cárnico altamente comercializado en España donde se realizó la caracterización del proceso de elaboración de este producto, las características de maduración se asemejan notablemente al producto elaborado en el actual trabajo. Sin embargo, en este estudio no se realizó la adición de cultivos iniciadores y el análisis se encaminó principalmente a los tiempos de maduración y al tipo de pieza cárnica utilizada para la realización de la cecina.⁵⁵

El análisis de calidad microbiológica mostró una disminución notable entre las etapas 1 (materia prima) y la etapa 2 (post salado), esto puede deberse principalmente a las altas concentraciones de sal y la capacidad de competencia que desarrollan algunas bacterias involucradas en el proceso de maduración.⁵⁶

Las sales cumplen un papel muy importante en todo el proceso de maduración de estos productos, estas tienen un efecto de solubilización de las proteínas desencadenando otros procesos bioquímicos y enzimáticos que ayudan con a la textura final del producto, adicional a esto realiza retención de agua evitando así la proliferación de microorganismos patógenos.

Sara Corral del ministerio de ciencia e innovación en el año 2010 realizó un producto crudo curado haciendo una comparación con diferentes concentraciones de sales donde en uno de los lotes reemplazaron los niveles de cloruro de sodio por cloruro de potasio donde no se evidenció efectos sobre el tiempo de maduración pero si se pudo notar una notable diferencia entre el sabor y olor de cada uno de los lotes, corroborando que las concentraciones indicadas de cloruro de sodio en estos productos en uno de los factores más importantes.⁵⁷

Se ha demostrado que estos productos pueden ser estables a nivel microbiológico con solo la adición de sales, pero los nitratos y nitritos además de disminuir aún más el riesgo de contaminación microbiológica ayuda a darles el sabor y color característicos, adicional a esto los cultivos iniciadores también promoverán para que el producto sea mucho más inocuo y tenga características organolépticas especiales con mayor preferencia para el consumidor.

Además de las concentraciones de sal es importante tener en cuenta factores externos en valores específicos como la temperatura, humedad y actividad de agua en todo el procesamiento para que el cloruro de sodio pueda ser penetrada por toda la pieza cárnica y realice su efecto. El centro de tecnología de Carnes en España afirma que al final del proceso de maduración en este producto debe contener entre un 5-6 % de concentración en cloruro de sodio, en comparación con el producto crudo curado elaborado en la etapa de maduración las concentraciones de sales fueron entre 6-7% teniendo valores más estables los lotes 3 y 4 que eran los que tenían adición de cultivos iniciadores.^{2, 10}

Martín Juárez en el año 2005 asegura que para un control de calidad microbiológico eficiente en este tipo de productos se necesita establecer técnicas para la detección de microorganismos patógenos y establecimiento de puntos críticos donde estos se puedan controlar si en algún momento llegan a contaminarse, en el presente estudio se manejaron 3 puntos que fueron materia prima, post salado y maduración.

En el primer punto crítico que fue el análisis de la materia prima se pudo observar que esta venia contaminada con concentraciones mínimas de *Coliformes* debido a la procedencia de la pieza cárnica, estos recuentos fueron inhibidos por completo en la segunda etapa de procesamiento que es el post-salado debido a las altas concentraciones de sales a las cuales fueron sometidas las piezas cárnicas.

Martín Juárez B en 2005 efectuó un experimento con salchichas fermentadas donde se realizó la inoculación de microorganismos patógenos y se dividieron en dos lotes, en uno agrego cultivos iniciadores y al otro solo altas concentraciones de sal, en este se pudo evidenciar que en todo el proceso los cultivos iniciadores inhiben de manera más rápida los microorganismos patógenos.⁴

Las bacterias ácido-lácticas tienen la capacidad de producir bacteriocinas que reducen de manera significativa los recuentos de los microorganismos patógenos sobre todo de especies de listeria, debido a que estos actúan en las primeras etapas de maduración creando un producto completamente inocuo sin afectar las características organolépticas del mismo. Estos cultivos también pueden poseer actividad de la amidasa oxidasa que ayuda a disminuir la cantidad de aminas biogénicas producidas in situ por diferentes especies de hongos.⁵³

Belén Martín en el año 2005 asegura que estas bacterias realizan un efecto conservador en las primeras etapas del procesamiento del alimento debido a la producción de ácido láctico, ácido fórmico, ácido graso y otras sustancias que además de contribuir a las mejoras del sabor en el producto son capaces de inhibir microorganismos patógenos como *Bacillus cereus*, *Clostridium Botulinum*, *Clostridium perfringens*, especies de *listeria*, *Staphylococcus aureus* entre otros que pueden ser adquiridos durante las siguientes etapas de maduración.⁴

Se realizó el estudio de los cultivos iniciadores *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* y *Staphylococcus xylosus* utilizados en la elaboración del producto cárnico, donde se pudo observar un crecimiento de bacterias ácido lácticas en las primeras etapas del proceso de maduración a diferencia de los cocos Gram positivos catalasa positiva que permanecieron en un crecimiento constante durante todo el proceso.

Frederic Leroy en el 2005 realizó una revisión bibliográfica sobre cultivos iniciadores utilizados en salchichas fermentadas donde encontró que las bacterias ácido lácticas hacen liberación de ácido acético y ácido láctico que contribuyen con la mejora en el sabor del producto en las primeras etapas de maduración, mientras que los cocos Gram positivos catalasa positiva realizan la modulación de aromas a través de la conversión de aminoácidos y ácidos grasos libres durante todo el proceso de maduración.⁵³

La prevalencia de *S. xylosus* en este tipo de productos se debe principalmente a su capacidad de resistencia a las sales debido a que este es una de las principales fuentes de crecimiento para los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus*, sin embargo, las especies de *Staphylococcus* poseen mayor resistencia a elevadas concentraciones de sal y bajo potencial redox a diferencia de *Micrococcus*.^{58, 59}

Martínez Onandi et al en 2015 realizó el estudio de las comunidades microbianas mayormente encontradas en jamones crudo-curados específicamente de jamón serrano, los jamones de alta concentración de NaCl tuvieron mayores recuentos de *Micrococcaceae* y especies de *Staphylococcus*, mientras que los jamones de concentración media de NaCl mostraron mayores recuentos de bacterias ácido lácticas. Por lo anterior el producto cárnico generado en el presente estudio genero mejor crecimiento para *S. xylosus* que para las BAL utilizadas en los tratamientos con cultivos iniciadores.⁵⁶

Uno de los parámetros fisicoquímicos estudiados fue la actividad de agua (A_w), en productos cárnicos crudo curados como la cecina la A_w desciende principalmente por la absorción de sales durante la etapa de salado y la pérdida de agua en el proceso de secado y maduración.⁵⁵

García, et al. en 1995 estudiaron la aw en cecina donde se observó una disminución desde 0,982 hasta 0,896 aproximadamente a partir de la etapa de salado hasta producto final.⁶⁰ Los resultados obtenidos en la elaboración del producto cárnico a partir de cordero como en el estudio anterior disminuyeron desde 0,99 hasta 0,77 en los tratamientos 1 y 2 (tratamientos sin cultivos iniciadores y 0,83 en los tratamientos 3 y 4 (tratamientos con cultivos iniciadores adicionados).

Las condiciones de actividad de agua en el inicio del proceso de fermentación favorecen el crecimiento de los microorganismos añadidos como las BAL, CGC+ y algunos mohos y levaduras utilizados en el proceso antes de que se dé la deshidratación producida por la difusión de sales, fermentación láctica y la reducción de nitritos, lo cual conlleva a la reducción de recuentos bacterianos diferentes a este tipo de cultivos que suelen ser más resistentes en estas condiciones.⁶⁰ En este caso la disminución de BAL se produjo a expensas del crecimiento de *Staphylococcus xylosus* gracias a su capacidad de resistencia altas concentraciones de NaCl, reducción de nitritos y por ende la disminución de aw no afectó su crecimiento.

En la carne fresca la aw es superior a 0.97, al final del salado los músculos superficiales alcanzan valores próximos a 0.9 y al final de la maduración se reducen a valores entre 0.80 y 0.89 lo anterior como consecuencia de la deshidratación mediada por la adición de sales. ⁶²

Arnau et al, en 1995 indicó que los valores de pH durante el proceso de elaboración del jamón crudo curado oscilan entre 5.6 y 6.2 entre los diferentes músculos de los perniles. El valor de pH disminuyó en el proceso de salazón, en el proceso de secado o descanso aumento debido probablemente a la presencia principalmente de cristales de sodio, proteólisis y la formación de compuestos básicos provenientes del musculo semimembranosus.⁶²

Los resultados obtenidos de pH en este proyecto mostraron una variación entre 5.8 – 6.3 en tres etapas de la elaboración del producto, estos resultados tienen concordancia con estudios anteriores (Córdoba, 1990; Gil et al., 1999, Fanco et al., 2002).^{64, 65,66}

En 2010 Corral S. y Flores M encontraron en embutidos curados una variación de pH obteniendo valores alrededor de 4.5 al inicio del proceso debido a la acción de las bacterias ácido lácticas, sin embargo, en la última etapa del proceso el pH tuvo un ligero aumento lo cual puede ser explicado por el aumento de la concentración de sustancias tampón, producción de amonio debida a la reducción del nitrito y disminución de electrolitos presentes en el producto.⁵⁷

Es importante resaltar que en esta investigación los recuentos de BAL se encontraron en menor proporción que los de *Staphylococcus xylosus* donde se encontró un crecimiento exacerbado de dicho microorganismo, teniendo en cuenta que la producción de ácido láctico es menos frecuente en este tipo de bacterias excepto en condiciones anaeróbicas y que a su vez estas tienen la capacidad de resistencia a altas concentraciones de sal el pH no tuvo una gran disminución al principio de proceso probablemente porque hubo mayor actividad de *S. xylosus* en el producto y por lo tanto las BAL no generaron la cantidad necesaria de ácido láctico para la disminución de este parámetro físico-químico. Sin embargo, los valores de pH no fueron ajenos a estudios nombrados anteriormente.¹⁰

6. CONCLUSIONES

Se demostró el crecimiento exacerbado de *Staphylococcus xylosum* al final de la maduración esto puede deberse principalmente a su capacidad de resistencia a altas concentraciones de sal. Las bacterias ácido-lácticas cumplen un papel crucial en las primeras etapas de la maduración debido a su alta capacidad fermentadora, pero al final de esta etapa descienden considerablemente debido al agotamiento de nutrientes y a la competencia con los CG+C+

El estudio de bacterias utilizadas como potenciales cultivos iniciadores abre las puertas a la creación de nuevos productos alimenticios que no solo tengan mejores características organolépticas, sino que además sean alimentos funcionales, beneficiosos para la salud.

Esta investigación contribuye a la implementación de un nuevo producto en la cadena cárnica ovina colombiana gracias a la creación de protocolos estándar establecidos en proyectos anteriores (Rada 2015) y con la adición de cultivos iniciadores para la mejora del producto como se realizó en el presente estudio, con ello se podría fomentar también la comercialización de este para el beneficio de los productores de la industria cárnica ovina.

Teniendo en cuenta el análisis de los microorganismos indicadores de calidad realizado bajo las normas técnicas colombianas (NTC) se puede notar que la inhibición de patógenos se logró en todos los tratamientos lo cual demuestra que tanto la adición de sales curantes como la de cultivos iniciadores influyen de igual manera en esta característica, cabe resaltar que el cultivo adicionado cumple una función protectora sobre todo en la inhibición de *Listeria monocytogenes* (microorganismo de importancia clínica en ETAs)

Los parámetros fisicoquímicos como la actividad de agua, pH y concentración de NaCl son de gran importancia en este tipo de productos debido a su relación con el crecimiento microbiano ejercido tanto por microorganismos alterantes y/o patógenos y los utilizados como cultivos iniciadores. Las altas concentraciones de sal cumplieron un papel importante teniendo en cuenta la disminución de A_w y con ello la inhibición de microorganismos indicadores de calidad. Sin embargo, el crecimiento de *S. xylosus* no fue impedido por ninguno de los factores estudiados.

El análisis sensorial sobre percepción del consumidor demuestra que los tratamientos que más gustaron fueron los tratamientos 3 y 4 los cuales tienen relevancia pues demostrarían la utilidad de los cultivos iniciadores en la mejora de las características organolépticas de este tipo de productos. Por lo tanto, es una buena alternativa la implementación de este tipo de producto en el mercado con la adición de cultivos iniciadores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Coronado C. Productos cárnicos madurados. 1st ed. [Internet]. Venezuela. 2005. [citado 21 de marzo 2017]. Disponible en: http://www.inces.gob.ve/wrappers/AutoServicios/Aplicaciones_Intranet/Material_Formacion/pdf/ALIMENTACION/ELABORADOR%20DE%20PRODUCTOS%20CARNICOS%2021412131/CUADERNOS/Productos%20C%C3%A1rnicos%20Madurados.pdf
2. Arnau J. Tecnología de elaboración del jamón curado [Internet]. 1993. Disponible en: <http://www.ciap.org.ar/ciap/Sitio/Archivos/El%20jamon%20curado%20aspectos%20tecnologicos%20microbiologicos%20y%20bioquimicos.pdf>
3. Mata Anguiano c. empleo de fermentos lácticos en la fabricación de productos cárnicos [doctorado]. universidad de Córdoba, facultad de veterinaria; 2018.
4. Martín Juárez B. Estudio de las comunidades microbianas de embutidos fermentados ligeramente acidificados mediante técnicas moleculares. Estandarización, seguridad y mejora tecnológica. [Doctorado]. Universidad de Girona; 2005.
5. Beldarraín T. CARACTERIZACIÓN DE CULTIVOS INICIADORES EN PRODUCTOS CÁRNICOS. PARTE 1. OceanDocs [Internet]. 2008 [consultado 30 mayo 2017] Disponible en: <https://www.oceandocs.org/bitstream/handle/1834/5024/Tatiana.pdf?sequence=1>

6. Torres Ruilova I. Desarrollo de un snack cárnico fermentado-seco-madurado, con valor funcional y estabilidad organoléptica, utilizando cepas de microorganismos fermentadores y cepas probióticas [Pregrado]. Escuela superior politécnica del litoral; 2008.
7. Domínguez Velásquez D. Evaluación de tres músculos de la pierna de cerdo en la elaboración de un jamón curado y madurado [Licenciatura]. Escuela Agrícola Panamericana; 2009.
8. Bañón Arias S, Martínez A, López A. Maduración de chorizo y salchichón de Chato Murciano con diferentes cultivos iniciadores (bacterias ácido-lácticas y estafilococos). Anales de Veterinaria de Murcia. 2011; 27(0).
9. Rubio Moreno R. Productos cárnicos fermentado curados funcionales y seguros. Nueva vía de ingestión [Doctorado]. Universidad de Girona; 2014.
10. Fernández hospital X. Estudio del efecto de la reducción del contenido de sales nitrificantes en la calidad microbiológica y aroma de los embutidos crudos curados [Doctorado]. Universidad complutense de Madrid; 2016.
11. Blanco Lizarazo C. Modelación matemática de la inactivación de *Listeria monocytogenes* por adición de cultivo iniciador en salami. Bogotá: Universidad Nacional; 2016. Disponible en: <http://iicta.bogota.unal.edu.co/wp-content/uploads/2017/02/1299D182.pdf>
12. Rada Bula A. Desarrollo de un producto cárnico crudo curado a partir de piernas de ovinos de pelo [Magister]. Universidad Nacional de Colombia; 2015.
13. ICONTEC. NTC 1325 (Industrias alimentarias. productos cárnicos procesados no enlatados). Bogotá; 2008.

14. FAO. FAO - División de Producción y Sanidad Animal [Internet]. Fao.org. 2017 [consultado: 20 marzo 2017]. disponible en: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/home.html>
15. Vanegas Fornia O, Valladares C. Clasificación de productos cárnicos [Internet]. 1st ed. Cuba. 2017 [consultado 20 marzo 2017]. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol13_1_99/ali11199.pdf
16. Agrimundo. Maduración de la carne: mejora sustancias de calidad [Internet]. Santiago de Chile: Ignacio Quezada; 2013. [consultado 23 marzo 2017] Disponible en: http://www.agrimundo.cl/wp-content/uploads/reporte_agrimundo_carnes_rojas.pdf
17. Fernández Hospital X. Estudio del efecto de la reducción del contenido de sales nitrificantes en la calidad microbiológica y aroma de los embutidos crudos curados [doctorado]. Universidad Complutense de Madrid; 2016. [consultado 23 marzo 2017] Disponible en: <http://eprints.ucm.es/38759/1/T37606.pdf>
18. FAO, Prodar. Fichas técnicas, Procesador de carnes. [Internet]. 1st ed.; [consultado 28 marzo 2017] Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-au165s.pdf>
19. Restrepo Molina D, Arango Mejía C, Amézquita A. INDUSTRIA DE CARNES. Medellín Colombia: Universidad Nacional; 2001.
20. Rubio Moreno R. PRODUCTOS CÁRNICOS FERMENTADO-CURADOS FUNCIONALES Y SEGUROS. NUEVA VÍA DE INGESTIÓN DE PROBIÓTICOS [Internet]. Dugi-doc.udg.edu. 2017 [consultado 26 agosto 2017]. Disponible en: <http://dugi-doc.udg.edu/bitstream/handle/10256/9821/trrm.pdf?sequence=1>

- 21.** Actividad de agua en los alimentos [Internet]. LAB-FERRER. 2005 [consultado 11 Junio 2017]. Disponible en: <https://avdiaz.files.wordpress.com/2008/09/actividad-del-agua.pdf>
- 22.** Hernández b, Hernández b, perfil V. Determinación de pH y acidez [Internet]. Analisisaproductoscarnicos.blogspot.com.co. 2017 [consultado 15 junio 2017]. Disponible en: <http:// analisisaproductoscarnicos.blogspot.com.co/2012/05/determinacion-de-ph-y-acidez.html>
- 23.** Prado Barragán L. Microbiología de la carne fresca y procesada [Internet]. ciudad de México: universidad Autónoma metropolitana; 2000 [consultado 15 mayo 2017]. Disponible en: http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/lapb/micro_carnes.pdf
- 24.** Editores B. Microbiología de la Carne [Internet]. BM Editores. 2017 [consultado 19 junio 2017]. Disponible en: <http://bmeditores.mx/microbiologia-de-la-carne/>
- 25.** Soto Varela Z, Pérez Lavalle L, Estrada Alvarado D. Bacteria causing of foodborne diseases: an overview at Colombia. Salud Uninorte. 2016; 32(1):105-122.
- 26.** Salmonella (no tifoidea) [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2017 [consultado 24 agosto 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>
- 27.** Elikagaien N. listeria monocytogenes [Internet]. Aracaute Araba: elika; 2006 [consultado 19 May 2017]. Disponible en: <http://www.elika.net/datos/riesgos/Archivo21/Listeria.pdf>

28. E. coli [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2017 [consultado 7 julio 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>
- Vega Bermúdez E. Clostridium Botulinum [Internet]. Microbiología aplicada. 2017 [[consultado Julio16 2017]. Disponible en: <https://microaplicada.files.wordpress.com/2008/04/clostridium-botulinum.pdf>
29. Botulismo [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2017 [consultado 1 agosto 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs270/es/>
30. SANTAMARÍA SALAMANCA M, GAMBOA BENAVIDES J, LONDOÑO SOTO B, ECHEVERRI R. EVALUACIÓN DE RIESGOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS ENTEROTOXIGÉNICO EN ALIMENTOS PREPARADOS NO INDUSTRIALES EN COLOMBIA [Internet]. Bogotá, Colombia: ministerio de salud y protección social; 2011 [consultado 11 agosto 2017]. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/investigacion/ueria/Publicaciones/ER%20STAPHYLOCOCCUS.pdf>
31. Zumalacárregui Rodríguez J. Tecnología del jamón crudo curado. 1st ed. Universidad de león. España; 1997. [consultado 28 marzo 2017] Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/11358129709487573>
32. Martínez B. Cultivos Iniciadores en Quesería: Tradición y Modernidad [Internet]. 2013 [consultado 30 marzo de 2017]. Disponible en: <http://es.slideshare.net/Dairybiotech/cultivos-iniciadores-en-quesera-tradicin-y-modernidad>
33. Sánchez Martínez J. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTERIAS LÁCTICAS SILVESTRES EN PRODUCTOS LÁCTEOS FERMENTADOS: ACTIVIDAD METABÓLICA Y PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS. [Internet]. UNIVERSIDAD DE OVIEDO; 2005. [consultado 30 marzo de 2017]. Disponible

en:<http://digital.csic.es/bitstream/10261/4796/1/Tesis%20JORGE%20I%20SAN%20CHEZ%20MARTINEZ.pdf>

34. Parra Huertas R. BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS: PAPEL FUNCIONAL EN LOS ALIMENTOS [Internet]. 1st ed. Universidad pedagógica y tecnológica de Colombia; 2010 [consultado 2 abril 2017]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12.pdf>
35. Martín Juárez B. Estudio de las comunidades microbianas de embutidos fermentados ligeramente acidificados mediante técnicas moleculares. Estandarización [Internet]. 1st ed. Girona, España; 2005 [consultado 3 abril 2017]. Disponible en: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/7790/Tbmj.pdf;jsessionid=F9E66A80977D9759F7CBB6F121B79ED4?sequence=1>
36. Vuyst a L, Zamfir M, Mozzi F, Adriany T, Marshall V, Degeest B Et al. Exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains as functional starter cultures in the production of fermented milks [Internet]. Sciencedirect.com. 2003 [consultado 4 abril 2017]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694603001055>
37. Beldarraín T, Cepero Y, Bruselas A, Santos R, Ramos M, Moya Y et al. CARACTERIZACIÓN DE CULTIVOS INICIADORES EN PRODUCTOS CÁRNICOS. PARTE 2 [Internet]. 1st ed. La Habana, Cuba; 2008 [consultado 4 abril 2017]. Disponible en: <http://www.oceandocs.org/bitstream/handle/1834/5024/Tatiana.pdf?sequence=1>
38. Grande Burgos J, Lucas R, López Aguayo C, Pérez Pulido R, Gálvez A. BIOCONSERVACIÓN DE ALIMENTOS CÁRNICOS [Internet]. 1st ed. Jaén,

España; 2011 [consultado 5 abril 2017]. Disponible en:
<https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4247301.pdf>

39. Londoño N, Torres Taborda M, Álvarez López C, Vélez Acosta L. BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS Y SU APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS [Internet]. 1st ed. 2015 [consultado 5 abril 2017]. Disponible en:
<http://alimentos hoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/download/356/306>
40. MATA ANGUIANO C. EMPLEO DE FERMENTOS LÁCTICOS EN LA FABRICACIÓN DE PRODUCTOS CÁRNICOS [Internet]. Helvia.uco.es. 1999 [consultado 10 agosto 2017]. Disponible en:
<http://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/219/13079128.pdf;jsessionid=1040757F20F80FEDD6F0A6D209DE9F35?sequence=1>
41. Cocconcelli P, Fontana C. Starter Cultures for Meat Fermentation [Internet]. 2010 [consultado 12 agosto 2017]. Disponible en:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780813820897.ch10/summary>
42. Micro. Staphylococcus xylosus [Internet]. Microbiology-micro.blogspot.com.co. 2011 [consultado 12 agosto 2017]. Disponible en:
<http://microbiology-micro.blogspot.com.co/2011/04/staphylococcus-xylosus.html>
43. Stahnke L. Aroma components from dried sausages fermented with Staphylococcus xylosus - ScienceDirect [Internet]. Sciencedirect.com. 1994 [consultado 10 agosto 2017]. Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0309174094900949>
44. E. KLOOS W, H. SCHLEIFER D. Simplified Scheme for Routine Identification of Human Staphylococcus Speciesg [Internet]. [consultado 13 agosto 2017].

Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC274946/pdf/jcm00233-0094.pdf>

45. deVries M, Vaughan E, Kleerebezem M, M.de Vos W. Lactobacillus plantarum— survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract - ScienceDirect [Internet]. Sciencedirect.com. 2006 [consultado 16 agosto 2017].

Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694605001809>

46. Perez M, Ramirez N. Utilización de bacterias lácticas termoresistentes como probióticos en productos cárnicos cocidos [Internet]. 2007 [consultado 17 agosto 2017].

Disponible en:
http://cbs.izt.uam.mx/nacameh/v1n2/nacameh_v1n2_087PerezChabelayRamirez.pdf

47. Wheater D. The Characteristics of Lactobacillus plantarum, L. helveticus and L. casei [Internet]. [consultado 18 agosto 2017].

Disponible en:
http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-12-1-133;jsessionid=WC3b1-sdB7DmdanJ_nMIXpkr.x-sgm-live-03

48. Gámez H, Jarrín V, Salas J. Crecimiento de L. plantarum y efecto sobre E. coli, S. typhimurium, c. perfringens, y s. aureus [Internet]. Revistabiotechnologia.unicauca.edu.co. 2015 [consultado 21 agosto 2017].

Disponible en:
<http://revistabiotechnologia.unicauca.edu.co/revista/index.php/biotechnologia/articloe/view/404/326>

49. Sacco System. Lyocarni VHI-41 [Internet]. 2017 [consultado 23 agosto 2017].

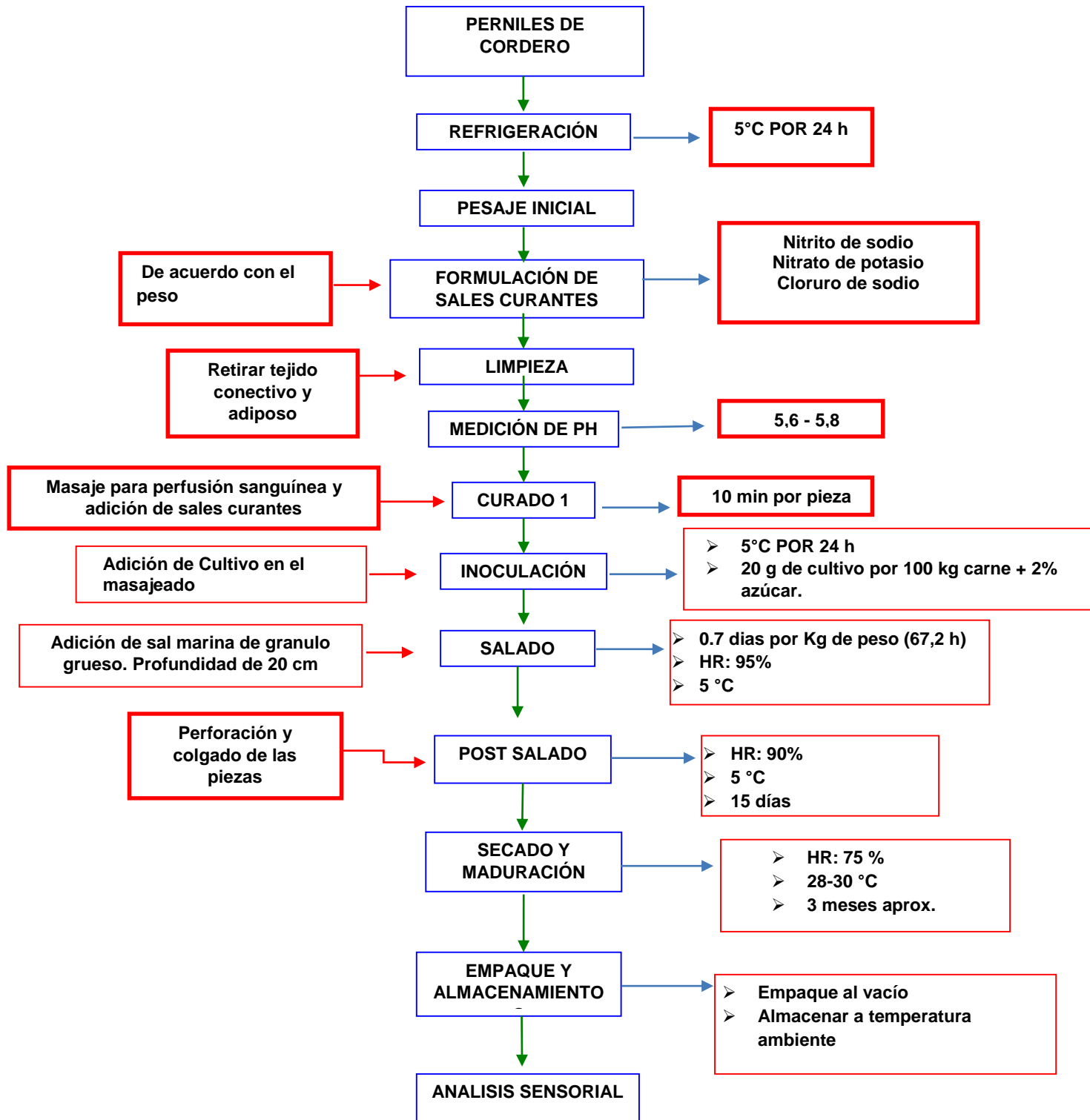
Disponible en: <http://www.saccosystem.com/prod/it/lyocarni-vhi-41-m92vhi41/3388/>

50. JGI. GENOME. Home - *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745 [Internet]. Genome.jgi.doe.gov. 2017 [consultado 24 agosto 2017]. Disponible en: <http://genome.jgi.doe.gov/pedpe/pedpe.home.html>
51. Herrera E. Cultivos Estárter: Seguridad, funcionalidad y propiedades tecnológicas. [Internet]. Academia.edu. [consultado 27 agosto 2017]. Disponible en: http://www.academia.edu/992790/Cultivos_Est%C3%A1rter_Seguridad_funcionalidad_y_propiedades_tecnol%C3%B3gicas
52. González Blanco S, Lavado Diaz M, Benito Gallardo I. Proceso de elaboración del jamón Ibérico.
53. Leroy F, Verluysten J, De Vuyst L. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2006; 106(3):270-285.
54. Von Bremen rodas i. oportunidad de mercado de la carne de cordero [pregrado]. universidad Icesi; 2015.
55. Molinero Sastre c. caracterización y optimización del proceso tecnológico de elaboración de la cecina de león [doctorado]. Universidad de Burgos, departamento de biotecnología y ciencia de los alimentos; 2009.
56. Martínez-Onandi N, Castioni A, San Martín E, Rivas-Cañedo A, Nuñez M, Torriani S et al. Microbiota of high-pressure-processed Serrano ham investigated by culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*. 2017; 241:298-307.
57. Corral silvestre S. efecto de la reducción de sal en la calidad de embutidos crudo curados [magister].
58. Universidad politécnica de Valencia; 2010.
59. Cordero M, Zumalacárregui J. Characterization of *Micrococcaceae* isolated from salt used for Spanish dry-cured ham. *Letters in Applied Microbiology*. 2000; 31(4):303-306.

60. Lorenzo, J.M., Fontán, M.C.G., Gómez, M., Fonseca, S., Franco, I., Carballo, J., 2012. Study of the Micrococcaceae and Staphylococcaceae throughout the manufacture of dry-cured Lacón (a Spanish traditional meat product) made without or with additives. *J. Food Res.* 1, 200–211
61. García I, Zumalacárregui J, Díez V. Microbial succession and identification of Micrococcaceae in dried beef cecina, an intermediate moisture meat product. *FoodMicrobiology.* 1995; 12:309-315.
62. Lücke F. Utilization of microbes to process and preserve meat. *MeatScience.* 2000; 56(2):105-115.
63. Ventanas J. Jamón Ibérico y serrano. Madrid: Mundi-Prensa; 2012.
64. Arnau J, Guerrero L, Casademont G, Gou P. Physical and chemical changes in different zones of normal and PSE dry cured ham during processing. *FoodChemistry.* 1995; 52(1):63-69.
65. Córdoba, J.J. Transformaciones de los componentes nitrogenados durante la maduración del jamón de cerdo Ibérico. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura;1990
66. Gil M, Guerrero L, Sárraga C. The effect of meat quality, salt and ageing time on biochemical parameters of dry-cured Longissimus dorsi muscle. *MeatScience.* 1999; 51(4):329-337.
67. Fanco I, Prieto B, Cruz J, López M, Carballo J. Study of the biochemical changes during the processing of Androlla, a Spanish dry-cured pork sausage. *FoodChemistry.* 2002; 78(3):339-345.

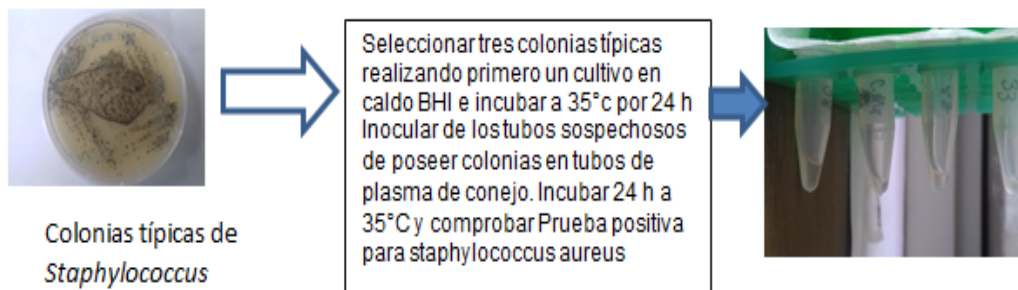
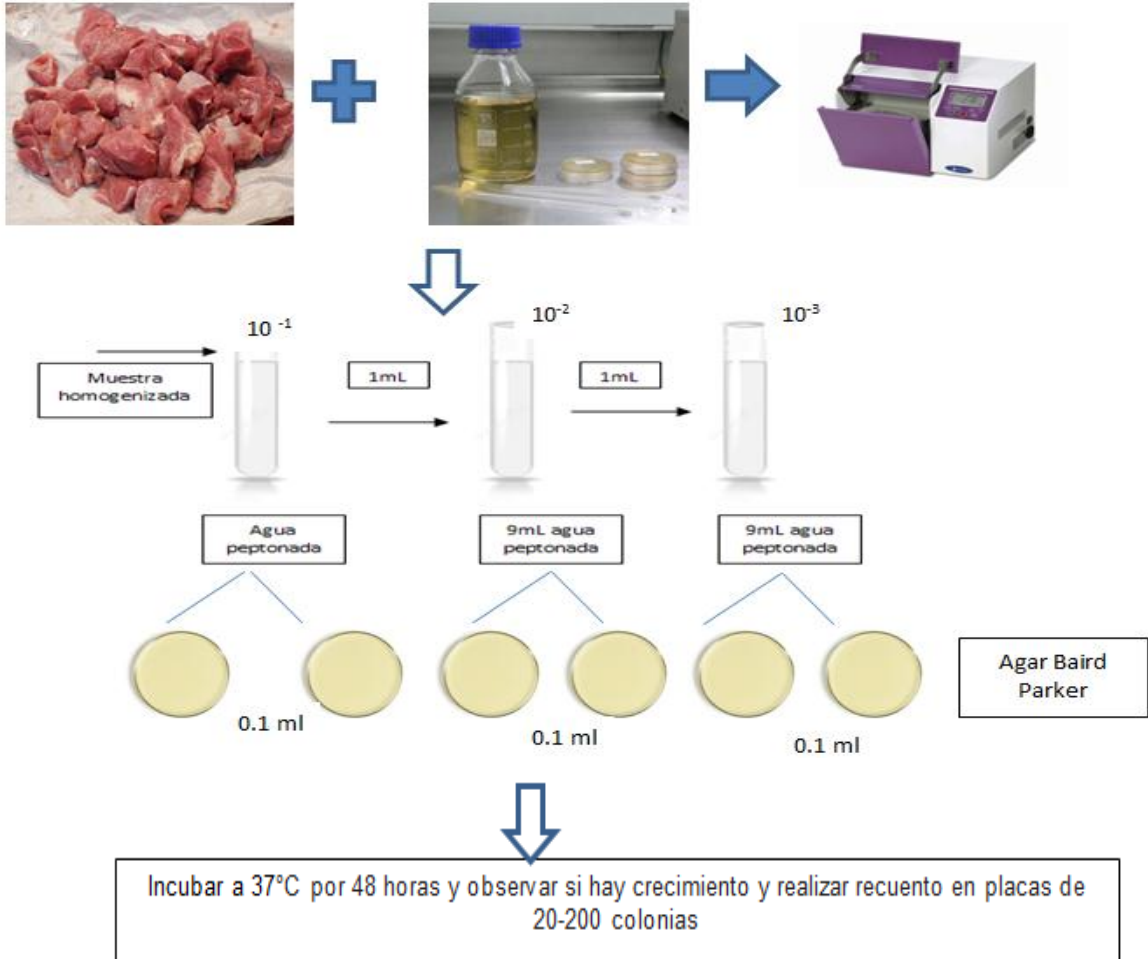
ANEXOS

ANEXO 1. Diagrama de flujo elaboración del producto cárnico

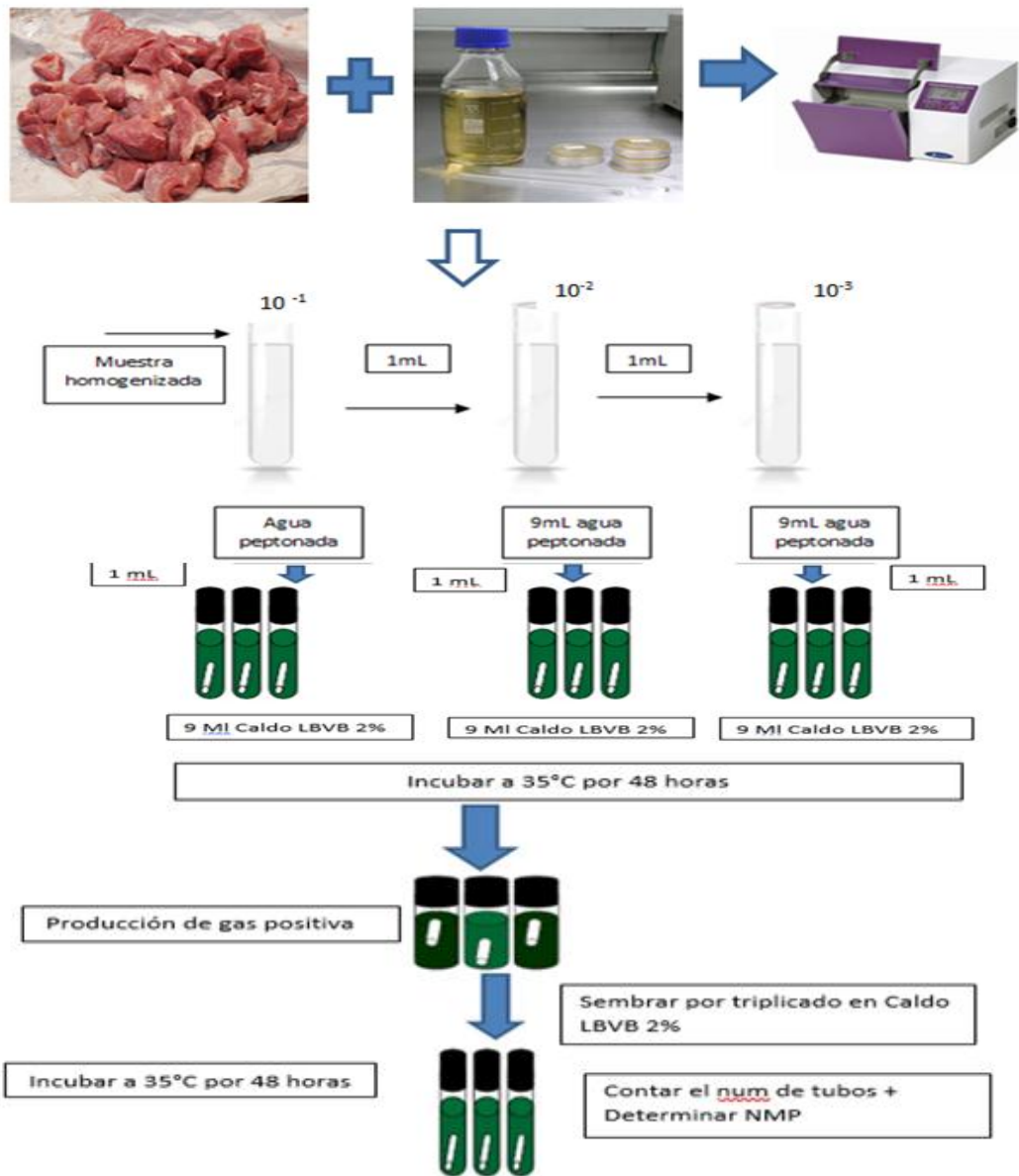


ANEXO 2. Protocolo de identificación de *Staphylococcus aureus* (NTC 4779) (ISO 6888-1)

10 gr de muestra + 90 ml de agua peptonada y homogenizarla



ANEXO 3. Protocolo de identificación de *Coliformes totales* (NTC 4516) (ISO 4831: 2006)



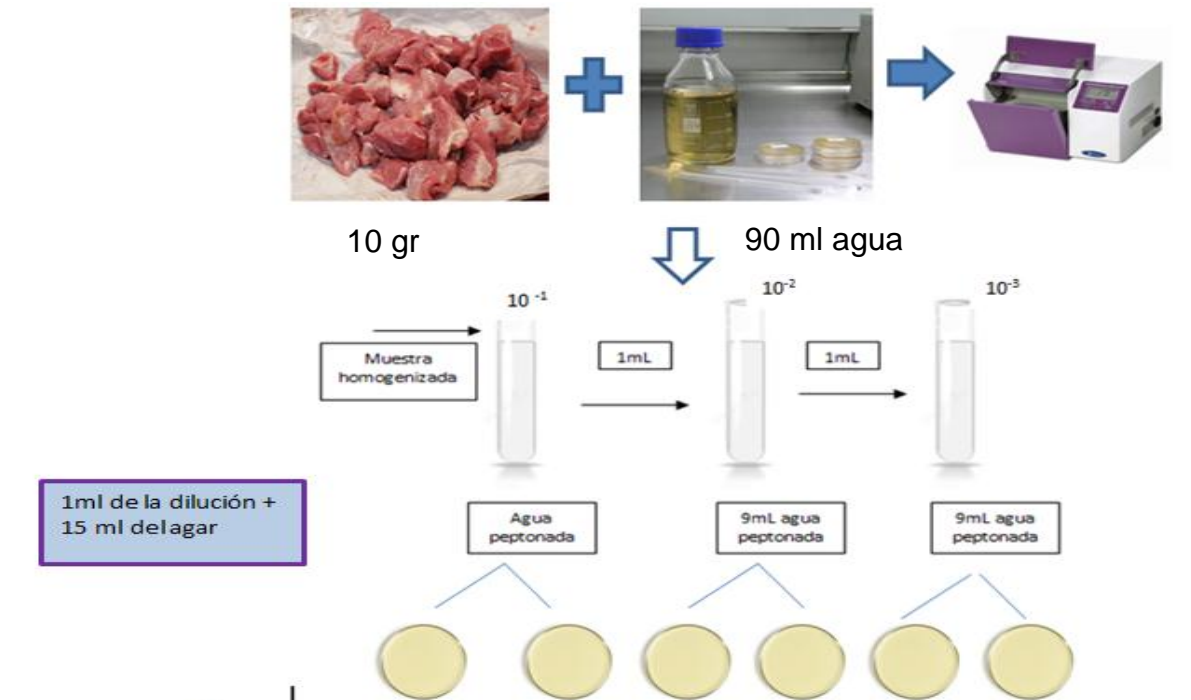
ANEXO 3. Protocolo de identificación de *Coliformes fecales* (NTC 4516)



Calcular el NMP de Coliformes fecales mediante la ecuación:

$$\text{NMP de Coliformes/g o ml} = \text{NMP de la tabla} \times \text{factor de dilución intermedia} / 100$$

ANEXO 4. Protocolo de identificación de *Mesófilos aerobios* (NTC 4519) (ISO 4833:2003)

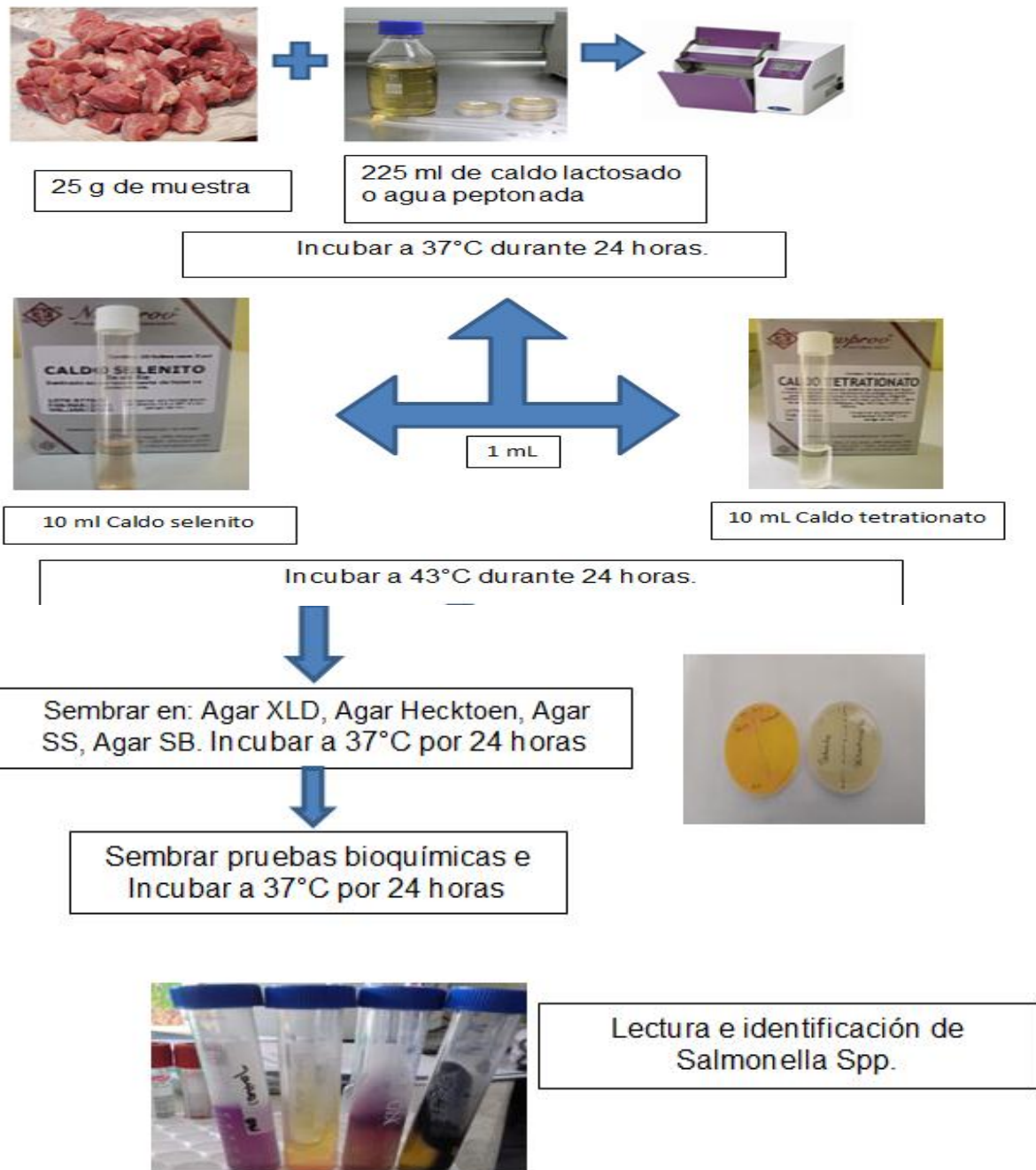


El tiempo transcurrido entre la inoculación de la muestra y el vertimiento del agar no debe superar los 15 min

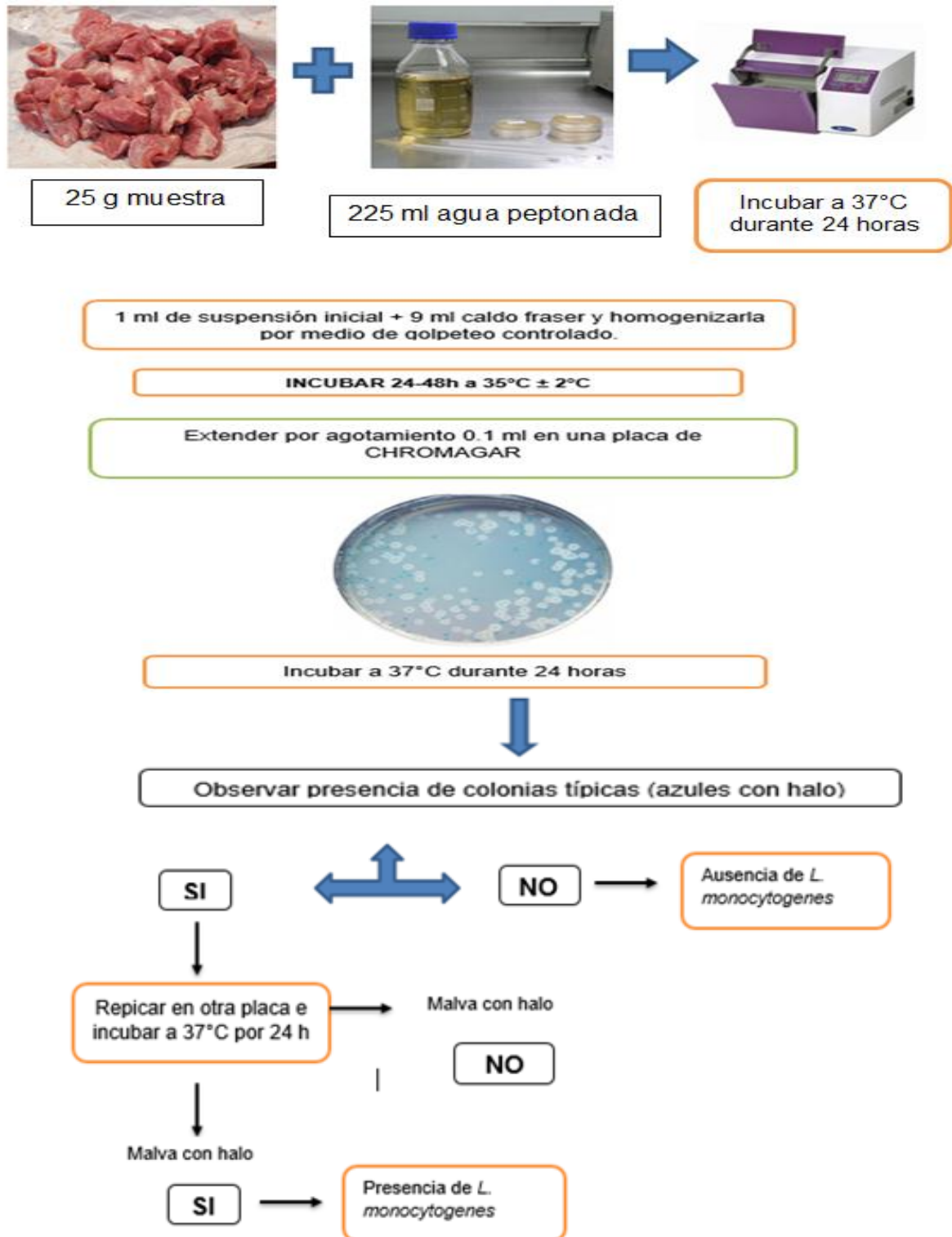
Incubar a 35°C por 72 horas y observar si hay crecimiento de microorganismos mesófilos. **No se deben apilar más de 6 cajas una encima de la otra, es conveniente dejar las pilas separadas una de la otra y de las paredes y parte superior de la incubadora.**

- Las colonias invasoras se deben considerar como una sola colonia, si menos de $\frac{1}{4}$ de la caja está invadida por estas colonias, se cuentan las colonias de la parte no afectada de la caja, si está invadido más de $\frac{1}{4}$ de la caja se desecha el recuento.
- Si no hay colonias en la dilución de mayor concentración informar el recuento como menor de 10 UFC/g
- Hacer recuentos de las placas entre 30 y 300 colonias

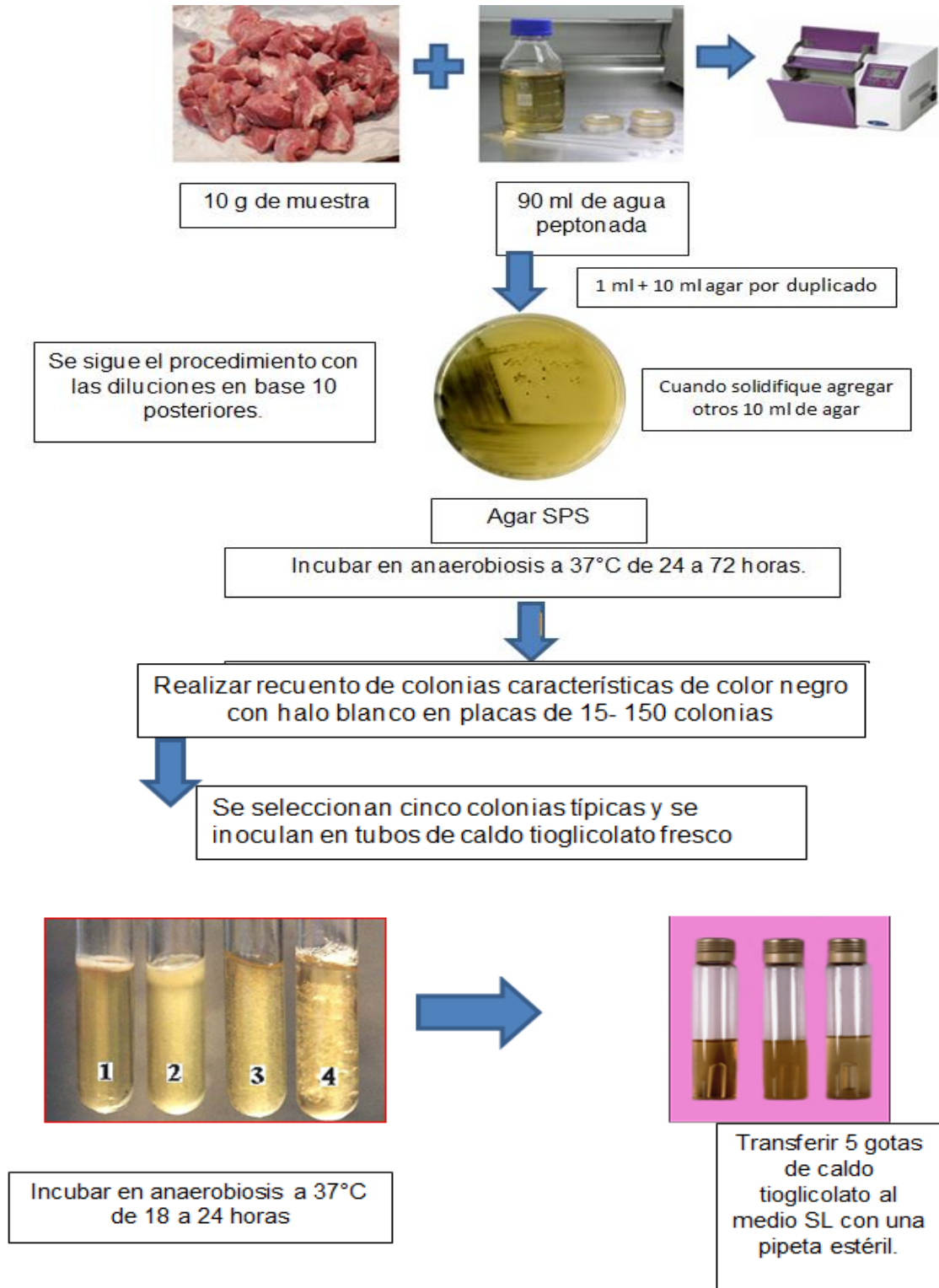
ANEXO 5. Protocolo de identificación de *Salmonella* spp. (NTC 4574) (ISO 6579:2002)



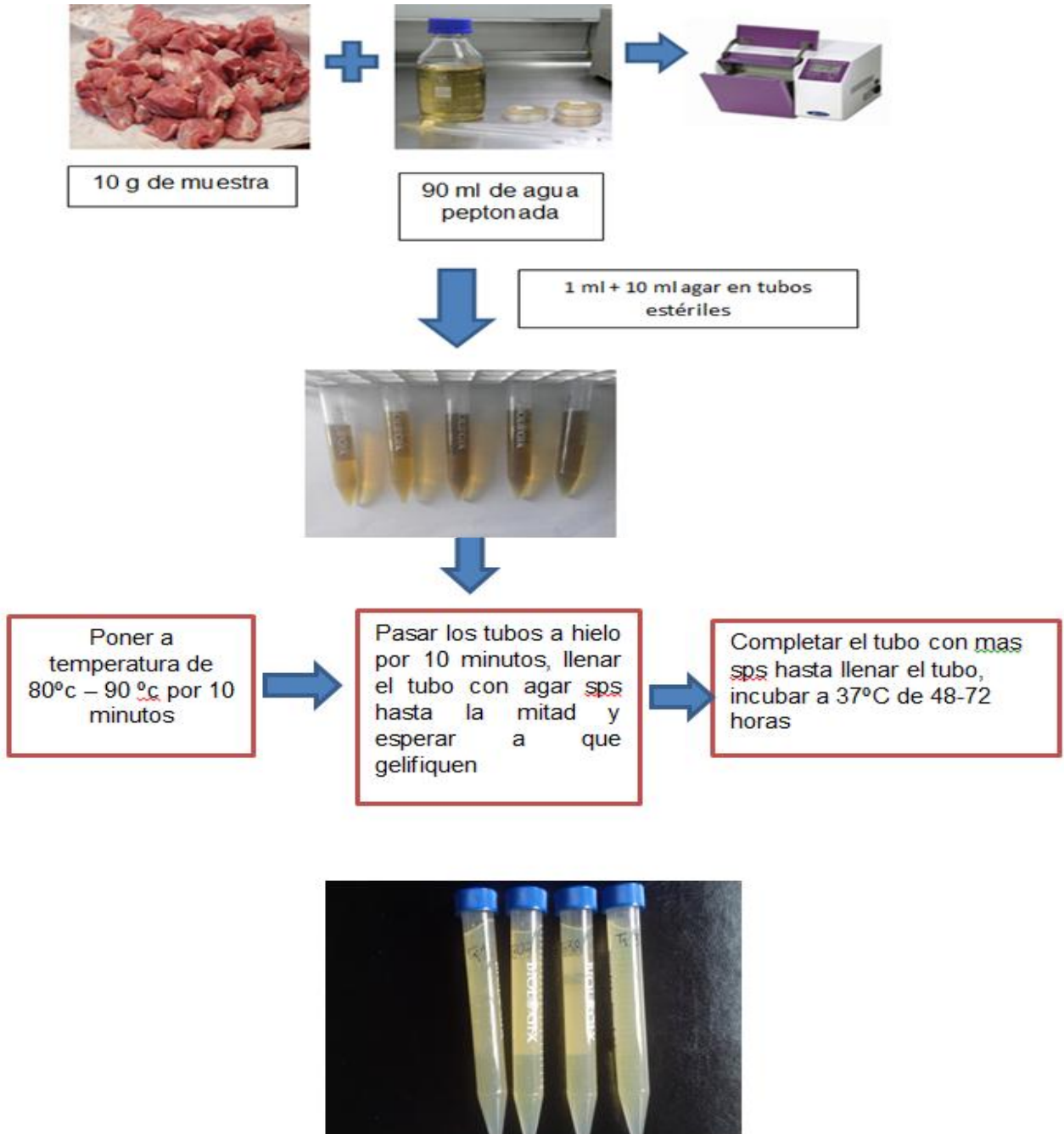
ANEXO 6. Protocolo de identificación de *Listeria monocytogenes* (NTC 4666, método modificado) (ISO 11290-1)



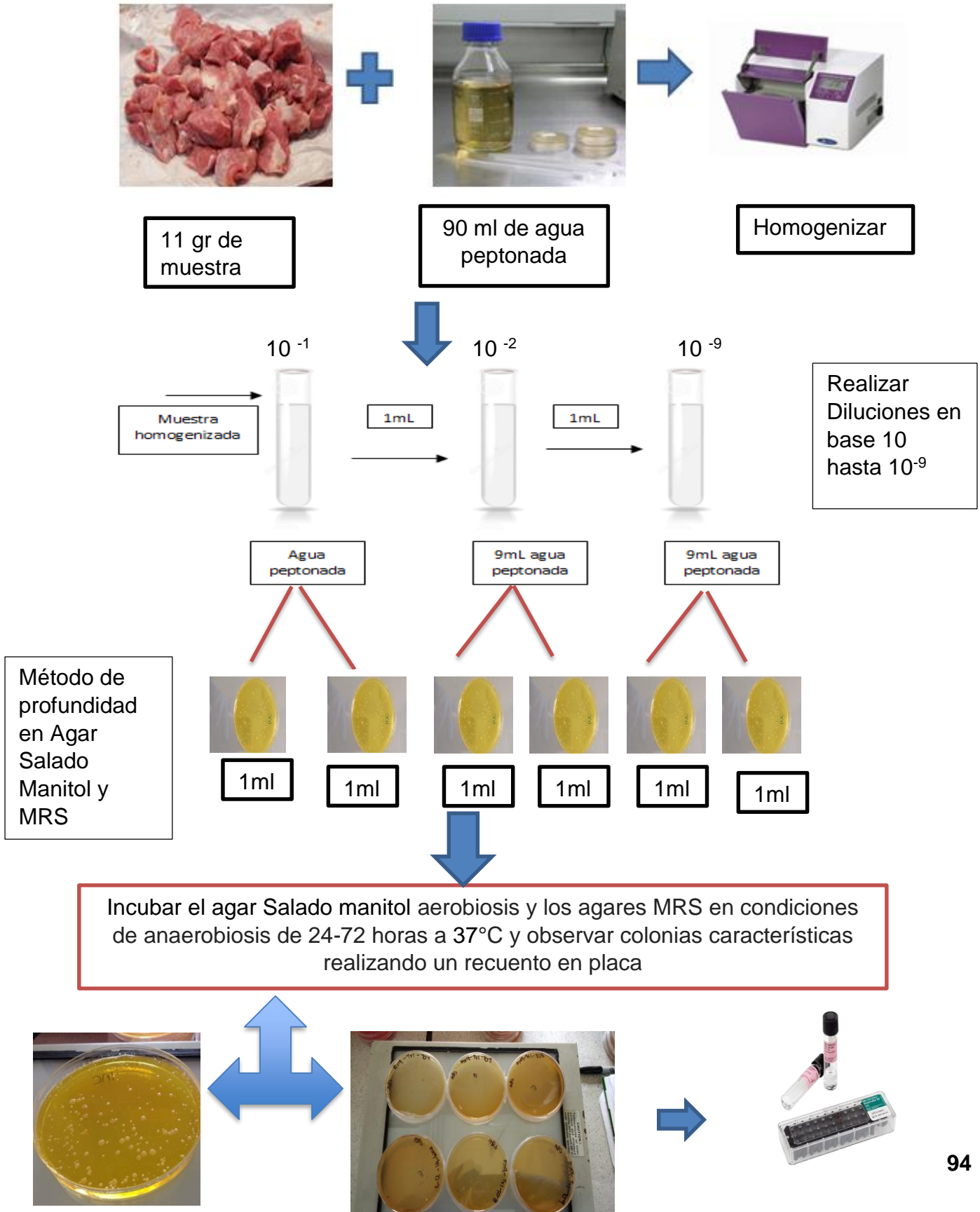
ANEXO 7. Protocolo de identificación de *Clostridium sulfito reductores* e identificación de *Clostridium perfringens* (NTC 4834) (ISO 15213).



ANEXO 8. Protocolo de identificación de esporas de *Clostridium Spp.* (Protocolo invima 10) (ICMSF)



ANEXO 9. Protocolo recuento de cultivos iniciadores



ANEXO 10. Resultados de los recuentos cultivos iniciadores

BACTERIAS ACIDO LACTICAS AGAR MRS		
TRATAMIENTO	POSTSALADO	PRODUCTO FINAL
TTO 1	6,204794872	4,238560627
TTO 2	6,991034609	4,951544993
TTO 3	7,392071179	7,211324385
TTO 4	7,884982076	7,573659541

Tabla 8. Recuentos totales de bacterias acido lácticas expresados en log UFC/gr

<i>Staphylococcus xylosus</i> AGAR salado manitol		
TRATAMIENTO	POSTSALADO	PRODUCTO FINAL
TTO 1	8,402933856	8,462216253
TTO 2	8,206399239	8,403191751
TTO 3	8,693262703	9,38244316
TTO 4	9,516906349	10,21380307

Tabla 9. Recuentos totales de bacterias *Staphylococcus xylosus* expresados en log UFC/gr

ANEXO 11. Resultados obtenidos de la medición de pH

Tratamiento	pH 48h-Sacrificio	pH 1	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
Promedio T1	5,79	6,14	5,94	5,97	5,98	5,94	5,97	5,95	6,13	6,27
Promedio T2	5,79	5,88	5,91	5,94	5,98	6,005	6,10	6,11	6,41	6,43
Promedio T3	5,80	5,96	6,05	5,87	6,005	5,92	5,95	5,95	6,13	6,22
Promedio T4	5,87	5,91	5,89	5,81	5,98	6,03	5,99	6,003	6,14	6,13

Tabla 10.Medición semanal de pH durante el proceso de elaboración del producto.
Resultados obtenidos del promedio de las mediciones de pH por tratamiento

TRATAMIENTO	MATERIA PRIMA	POSTSALADO	PRODUCTO FINAL
TTO 1	5,803	5,945	6,354
TTO 2	5,803	5,91875	6,46
TTO 3	5,803	6,0575	6,3
TTO 4	5,803	5,89625	6,494

Tabla 11.pH promedio en tres etapas de la elaboración del producto cárnico.

ANEXO 12. Mediciones de actividad de agua

TRATAMIENTO	MATERIA PRIMA	POSTSALADO	PRODUCTO FINAL
TTO 1	0,99	0,849	0,796
TTO 2	0,99	0,856	0,754
TTO 3	0,99	0,879	0,82
TTO 4	0,99	0,907	0,566

Tabla 12. Resultados actividad de agua promedio de cada tratamiento durante la elaboración del producto cárnico. Los datos fueron proporcionados por el ICTA, Universidad nacional de Colombia

ANEXO 13. Mediciones de cloruro de sodio

TRATAMIENTO	M. PRIMA	POSTSALADO	PRODUCTO FINAL
TTO 1	0,175	4,485	6,805
TTO 2	0,175	4,29	7,735
TTO 3	0,175	3,05	6,64
TTO 4	0,175	4,21	6,015

Tabla 13. Resultados difusión de sal en el producto, (Cloruro de Na%) promedio de cada tratamiento durante la elaboración del producto cárnico. Los datos fueron proporcionados por el ICTA, Universidad nacional de Colombia