UCC UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA JESUITAS | Sistema de Bibliotecas

PRODUCCIÓN ACADÉMICA

Agüero, Nadia de Lourdes

Evaluación de la capacidad de bacterias probióticas para desarrollarse y mantener sus propiedades en matrices cárnicas crudo-curadas fermentadas

Tesis para la obtención del título de posgrado de Doctora en Ciencias Agropecuarias

Director: Rosmini, Marcelo Raúl

Documento disponible para su consulta y descarga en Biblioteca Digital - Producción Académica, repositorio institucional de la Universidad Católica de Córdoba, gestionado por el Sistema de Bibliotecas de la UCC.

Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA

Universidad Jesuita

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Doctorado en Ciencias Agropecuarias

Evaluación de la capacidad de bacterias probióticas para desarrollarse y mantener sus propiedades en matrices cárnicas crudo-curadas fermentadas

Autora

Méd. Vet. Nadia de Lourdes Agüero

Director

Dr. M.Sc. Méd. Vet. Marcelo Raúl Rosmini

Codirector

Dr. M.Sc. Méd. Vet. Laureano Sebastián Frizzo

CÓRDOBA

- 2023 -

Página de respeto

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE BACTERIAS PROBIÓTICAS PARA DESARROLLARSE Y MANTENER SUS PROPIEDADES EN MATRICES CÁRNICAS CRUDO-CURADAS FERMENTADAS

RESUMEN

En la última década, hay una gran preocupación por el consumo de carne roja y/o procesada pues muchos estudios asocian la ingesta de estos productos con incidencia y prevalencia de enfermedades. Los productos cárnicos con ingredientes funcionales añadidos, o que contienen cantidades menores de ingredientes no beneficiosos para la salud tienen una mayor demanda. El objetivo de este estudio fue investigar microorganismos probióticos para su uso como cultivos iniciadores en la producción de salames. Se estudiaron un total de 8 cepas evaluando características tecnológicas y de seguridad incluyendo capacidad de crecimiento, producción de ácido láctico, formación de gases, actividad catalasa, actividad nitrato reductasa, actividad proteolítica, actividad lipolítica, producción de peróxido de hidrógeno, tolerancia a la sal, crecimiento a bajas temperaturas, descarboxilación de aminoácidos y actividad antimicrobiana frente a patógenos asociados al producto. *Lactobacillus rhamnosus* Lr-32, fue la cepa más prometedora para su uso como cultivo iniciador. Se elaboraron 50 kg de salames divididos en tres lotes, un lote fue fabricado sin agregado de cultivo iniciador, en otro se utilizó el iniciador comercial Bactoferm F1-100 (*P. pentosaceus* + *S. xylosus*) y el tercer lote fue elaborado utilizando la cepa *L. rhamnosus* Lr-32 + *S. xylosus*. A continuación, se evaluó el pH, pérdida de peso, color y aceptabilidad del producto. Se realizaron recuentos microbiológicos y se buscó identificar el probiótico inoculado mediante técnica de PCR y PFGE y monitorear el mantenimiento de sus propiedades probióticas. Este trabajo permitió concluir que *L. rhamnosus* Lr-32 resulta apropiado para actuar como iniciador de salame.

Palabras claves: probiótico; salame; carnes saludables; lactobacilos

EVALUATION OF THE ABILITY OF PROBIOTIC BACTERIA TO DEVELOP AND MAINTAIN THEIR PROPERTIES IN FERMENTED RAW CURED MEAT MATRICES

SUMMARY

In the last decade, there has been great concern about the consumption of red and/or processed meat, since many studies associate the intake of these products with the incidence and prevalence of diseases. Meat products with added functional ingredients or containing minor amounts of unhealthy and health-damaging ingredients are in greater demand. The objective of this study was to investigate probiotic microorganisms for use as starter cultures in salami production. A total of 8 strains were studied evaluating technological and safety characteristics including the ability to grow, lactic acid production, gas formation, catalase activity, nitrate reductase activity, proteolytic activity, lipolytic activity, hydrogen peroxide production, salt tolerance, performance at low temperatures, decarboxylation of amino acids and antimicrobial activity against pathogens associated with the product. *Lactobacillus rhamnosus* Lr-32 was the most promising strain for use as a starter culture. 50 kg of salami divided into three batches were elaborated, one batch was manufactured without the addition of starter culture, in another the commercial starter Bactoferm F1-100 (*P. pentosaceus* + *S. xylosus*) was used and the third batch was elaborated using *L. rhamnosus* Lr-32 + *S. xylosus*. Next, the pH, weight loss, color and acceptability of the product were evaluated. Microbiological counts were carried out, the objective was to identify the inoculated probiotic by PCR and PFGE technique and to monitor the maintenance of its probiotic properties. This work allowed us to conclude that *Lactobacillus rhamnosus* Lr-32 is appropriate to act as a salami starter.

Key words: probiotic; dry fermented sausages; healthy meats; lactobacillus

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE BACTERIAS PROBIÓTICAS PARA DESARROLLARSE Y MANTENER SUS PROPIEDADES EN MATRICES CÁRNICAS CRUDO-CURADAS FERMENTADAS.

Doctorado en Ciencias Agropecuarias

Méd. Vet. Nadia de Lourdes Agüero

2023

Director: Dr. M.Sc. Vet. Marcelo Raúl Rosmini

Codirector: Dr. M.Sc. Vet. Laureano Sebastián Frizzo

Tribunal Evaluador

Dr. M.Sc. Vet. José Ángel Pérez Alvarez

Dra. Mara C. Romero

Dra. Lorena Soto

A mi familia,
especialmente en honor a mi madre.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a la Universidad Católica de Córdoba por facilitarme la realización de este Doctorado, hecho posible gracias a su Sistema de Becas Doctorales y por ser el ámbito donde se desarrolló este proyecto.

A mi director, el Dr. Marcelo Rosmini, quien con su ejemplo y apoyo me motivó a la realización de este trabajo, me acompañó en los momentos más difíciles y me incentivo constantemente a cumplir este objetivo.

A mi codirector, el Dr. Laureano Frizzo, que fue mi guía a lo largo de todo el proceso, quien compartió conmigo humildemente sus conocimientos y destrezas pero que además fue un amigo, sostén y constante motivador.

A mi colega, el Dr. Gonzalo Aleu, con quien nos iniciamos y apoyamos en este camino formativo.

Al Tec. Alfredo Mier, gran amigo y gran apoyo logístico, que me acompañó durante largas jornadas de trabajo, y que con sus conocimientos me ayudó a la realización de los ensayos.

A los docentes, administrativos y alumnos de las carreras de Veterinaria y Licenciatura en Tecnología de los Alimentos por su participación durante el proyecto.

A los equipos de investigación de los que formé parte.

Al equipo de trabajo del Departamento de Salud Pública Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral, quienes desinteresadamente compartieron sus conocimientos y fueron de ayuda en el trabajo, en particular a la Dra. Virginia Zbrun por ser guía y ayuda en el área de biología molecular.

A todos los investigadores que me cedieron sus cepas para el estudio y al Frigorífico Picone, quien me brindó sus instalaciones y personal para la elaboración de los salames, sin los cuales este trabajo no hubiese podido ser realizado.

Especialmente al Dr. Arthur Ouwehand, quien a través de su apoyo humano, científico y económico me permitió realizar la publicación de un artículo científico.

Al Dr. Gabriel Sequeira, la Dra. Georgina Díaz Napal, al Dr. Eduardo Frank y la Dra. Edith Taleisnik, las secretarias Carina Vargas y Lorena Robledo, quienes desde su función en el área de Investigación y Posgrado de la FCA de la UCC me allanaron el camino.

A los evaluadores de tesis por acompañarme a lo largo del desarrollo de esta investigación, por sus aportes que mejoraron la calidad de la misma y por dedicar su tiempo a la corrección de este trabajo.

A todos los que con su ejemplo o sabiduría me ayudaron a transitar este camino.

Finalmente quiero agradecer a mi familia. Especialmente a mi madre quien siempre confió en mí y fue un apoyo constante, un estímulo permanente y un ejemplo de esfuerzo para mí. A mi hermana, quien es ejemplo de perseverancia y superación. Ellas dos con su amor infinito e incondicional estuvieron siempre presentes y con una palabra de aliento me dieron fuerza para seguir trabajando durante estos años.

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE FIGURAS ..... *XIII*
LISTA DE ABREVIATURAS ..... *XV*
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN *1*
I.1. Reseña del problema. 1
I.2. Hipótesis De Trabajo 4
I.3. Objetivo General 4
I.4. Objetivos Específicos 4
CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA *6*
II.1. Productos cárnicos crudo-curados fermentados. 6
II.2. Cultivos iniciadores. 19
II.3. Alimentos funcionales. 22
II.4. Utilización de microorganismos probióticos. 24
II.5. Productos cárnicos fermentados con probióticos. 28
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS *32*
III.1. Muestras. 32
III.2. Cuantificación de cepas. 35
III.3. Producción de ácido y gas a partir de carbohidratos. 36
III.4. Producción de ácido láctico. 36
III.5. Efecto de la temperatura en el crecimiento de bacterias ácido lácticas probióticas. 37
III.6. Efecto del pH, nitrito de sodio y cloruro de sodio en la supervivencia y crecimiento de bacterias ácido lácticas probióticas. 38
III.7. Caracterización enzimática. 39
III.7.1. Producción de peróxido de hidrógeno. 39
III.7.2. Actividad catalasa e hidrólisis del peróxido de hidrógeno. 40
III.7.3. Reducción de nitratos y nitritos. 40
III.7.4. Hidrólisis de la caseína de la leche. 41
III.7.5. Actividad lecitinasa y lipasa. 42
III.8. Antagonismo contra *Staphylococcus xylosus* 42
III.9. Descarboxilación de aminoácidos. 43
III.10. Antagonismo contra patógenos asociados a salames. 44
III.11. Enumeración selectiva de *L. rhamnosus* Lr-32. 45
III.12. Elaboración de los salames. 46
III.13. Determinaciones fisicoquímicas. 48
III.13.1. Medición de pH. 48
III.13.2. Pérdida de peso. 49

III.13.3. Medición objetiva del color. 49

III.14. Determinaciones microbiológicas. 50

III.15. Análisis de aceptabilidad. 50

III.16. Aislamiento e identificación de *Lactobacillus rhamnosus* Lr-32. 53

III.16.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). 54

III.16.1.1. Extracción del ADN bacteriano, amplificación del ADNr 16S y secuenciación del fragmento amplificado. 54

III.16.2. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE). 55

III.16.2.1. Digestión de ADN genómico. 56

III.16.2.2. Electroforesis en campo pulsado. 56

III.17. Tolerancia a la acidez y a las sales biliares. 57

III.18. Análisis estadístico. 58

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 59

IV.1. Cuantificación de cepas. 59

IV.2. Producción de ácido y gas a partir de carbohidratos. 61

IV.3. Producción de ácido láctico. 63

IV.4. Efecto de la temperatura en el crecimiento de BAL probióticas. 65

IV.5. Efecto del pH, nitrito de sodio y cloruro de sodio en la supervivencia y crecimiento de BAL. 66

IV.6. Caracterización enzimática. 68

IV.6.1. Producción de peróxido de hidrógeno. 68

IV.6.3. Reducción de nitratos y nitritos. 71

IV.6.4. Hidrólisis de la caseína de la leche. 71

IV.6.5. Actividad lecitinasa y lipasa. 73

IV.7. Antagonismo contra *Staphylococcus xylosus*. 75

IV.8. Descarboxilación de aminoácidos. 76

IV.9. Antagonismo contra patógenos asociados a salames. 79

IV.10. Selección de cepa BAL probiótica como cultivo iniciador. 84

IV.11. Enumeración selectiva de *L. rhamnosus* Lr-32. 85

IV.12. Determinaciones fisicoquímicas. 88

IV.12.1. Medición de pH. 88

IV.12.2. Medición pérdida de peso. 91

IV.12.3. Medición objetiva del color. 93

IV.13. Determinaciones microbiológicas. 97

IV.14. Aceptabilidad. 104

IV.15. Aislamiento e identificación de *Lactobacillus rhamnosus* Lr-32. 109

IV.15.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). 109

IV.15.2. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). 111

IV.16. Tolerancia a la acidez y a las sales biliares. 112

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES FINALES 115

CAPÍTULO VII. ANEXOS. 133

Anexo VII.1. Elaboración de productos y mediciones. 133

Anexo VII.2. Determinaciones fisicoquímicas. 137

Anexo VII.3. Determinaciones microbiológicas. 137
Anexo VII.4. Panel sensorial. 139
Anexo VII.5. Identificación molecular. 142
Anexo VII.6. Pruebas probióticos. 142

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de elaboración de salames. 48
Figura 2. Curvas estándar de calibración utilizadas para cuantificar BAL probióticas. 61
Figura 3. Fermentación de carbohidratos con producción de ácido sin generación de gas. 62
Figura 4. Ácido láctico producido (mM) en caldo MRS luego de incubar por 48 h a 22°C. 64
Figura 5. Crecimiento de cepas en medio de cultivo que simula la etapa de fermentación de un salame. 67
Figura 6. Crecimiento de cepas en medio de cultivo que simula la etapa de maduración de un salame. 68
Figura 7. Baja producción de peróxido de hidrógeno. 69
Figura 8. Alta producción de peróxido de hidrógeno. 70
Figura 9. Hidrólisis de la caseína de la leche. 72
Figura 10. Hidrólisis de ácidos grasos. 74
Figura 11. Hidrólisis de ácidos grasos. 74
Figura 12. Descarboxilación de aminoácidos. 79
Figura 13. Técnica de Difusión en agar. 82
Figura 14. Morfología de colonias de L. rhamnosus Lr-32. 88
Figura 15. Valor de pH durante fermentación (D0, D1, D2) y secado/maduración (D3, D5, D7, D9, D11, D13). 90
Figura 16. Curva de pérdida de peso durante fermentación (D0, D1, D2) y secado/maduración (D3, D5, D7, D9, D11, D13). 92
Figura 17. Luminosidad (L).* 95
Figura 18. Coordenada a.* 96
Figura 19. Coordenada b.* 96
Figura 20. Recuento de bacterias ácido lácticas (log10 UFC/g) durante fermentación (D0, D2), secado/maduración (D7, D14) y conservación (D21, D28, D35, D49, D63, D77, D95). 103
Figura 21. Recuento de Staphylococcus (log10 UFC/g) durante fermentación (D0, D2), secado/maduración (D7, D14) y conservación (D21, D28, D35, D49, D63, D77, D95). 104
Figura 22. Recuento de enterobacterias (log_{10} UFC/g) durante fermentación (D0, D2), secado/maduración (D7- D14). 104
Figura 23. Grado de aceptabilidad de salames. 108
Figura 24. Gel de agarosa con diferentes grupos de restricción. 110
Figura 25. Patrones de PFGE de ADN genómico. 112

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Requisitos de las cepas BAL, CCN, levaduras y hongos para ser utilizadas como cultivos iniciadores para salames. 22
Tabla 2. Principales propiedades de los microorganismos probióticos. 28
Tabla 3. Cepas bacterianas utilizadas en los ensayos. 35
Tabla 4. Valoración de Aceptabilidad. 53
Tabla 5. Descarboxilación de aminoácidos. 78
Tabla 6. Actividad antimicrobiana (técnica de la mota en el césped). 81
Tabla 7. Actividad antimicrobiana en microplacas. 82
Tabla 8. Características tecnológicas y de seguridad de las bacterias probióticas comerciales. 83
Tabla 9. Criterios de selección de cepas según los resultados obtenidos. 85
Tabla 10. Crecimiento de cepas en medio de cultivo selectivo. 87
Tabla 11. Crecimiento de L. rhamnosus Lr-32 en medio de cultivo selectivo. 87
Tabla 12. Medición de pH. 91
Tabla 13. Medición de pérdida de peso (ME %). 92
Tabla 14. Parámetros de color de salames. 95
Tabla 15. Recuentos microbiológicos de salames (Log_{10} UFC/g). 103
Tabla 16. Crecimiento (DO_{600}) a diferentes niveles de pHs y concentraciones de sales biliares. 114

LISTA DE ABREVIATURAS

a*: Coordenada color rojo-verde.

a_w: Actividad de agua.

b*: Coordenada color amarillo-azul.

BAL: Bacterias ácido lácticas.

BHI: Cerebro Corazón Infusión.

CAA: Código Alimentario Argentino.

CCN: Cocos coagulasa negativo.

CAT: Catalasa.

DFD: Seco, firme y oscuro.

DO: Densidad óptica.

Eh: Potencial redox.

ELC: Extracto libre de células.

EFS-SPE: Extracción en fase sólida de intercambio iónico.

FOSHU: *Food for Specified Health Use.*

HR: Humedad relativa.

HRP: Peroxidasa de rábano.

HPLC: Cromatografía líquida de alta performance.

L*: Luminosidad.

Me: Merma.

MSA: Manitol Salado Agar.

MRS: Man, Rogosa y Sharpe.

MRS-V: Man, Rogosa y Sharpe Vancomicina.

pH: Potencial de hidrógeno.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PFGE: *Pulsed Field Gel Electrophoresis.*

PSE: Pálida, blanda y exudativa.

SOD: Superóxido dismutasa.

TMB: Tetrametilbencidina.

UFC: Unidades Formadoras de Colonias.

VRBGA: Violeta cristal- Rojo neutro- Bilis- Glucosa- Agar.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

I.1. Reseña del problema.

Desde hace ya un tiempo las personas se están interesando y preocupando por el rol que cumple la dieta alimentaria en su salud. En este contexto, el interés de los consumidores por alimentos más saludables se ha incrementado intensamente.

Lamentablemente, estudios epidemiológicos recientes han documentado que el consumo de productos cárnicos está relacionado con la prevalencia de una amplia gama de enfermedades emergentes como la obesidad, el cáncer, enfermedades relacionadas con el corazón y varios otros trastornos (Alshahrani et al., 2019; Sirini et al., 2022b; Virtanen et al., 2019; WHO, 2020a; WHO, 2020b; WHO, 2020c) y muchos consumidores a menudo asocian a la carne con una imagen negativa, por su supuesto contenido elevado de grasa. También el consumo de NaCl, el cual es agregado en muchos productos cárnicos durante su procesamiento, ha sido asociado a hipertensión arterial. Por esta razón, la ingestión de carne y productos cárnicos se evita usualmente para reducir los riesgos de cáncer, obesidad y otras enfermedades.

Sin embargo, no se puede dejar pasar por alto que la carne cumple un rol crítico en el mantenimiento de la salud de los seres humanos. En muchos países la carne es la mayor fuente de proteínas ingerida en los alimentos, también es una excelente fuente de nutrientes, minerales y vitaminas. Algunos de estos nutrientes (vitamina B12, hierro y ácido fólico) no están presentes o tienen menor biodisponibilidad en otros alimentos. Aunque se ha discutido extensamente la importancia de la carne y los productos cárnicos en la salud de los consumidores en muchos artículos científicos, los esfuerzos para mejorar la educación de los consumidores y la información concerniente a la ingestión de carne, todavía es insuficiente en muchos países (Arihara, 2006).

En el siglo XXI, desde que el foco de nutrición está cambiando hacia el concepto de “nutrición óptima”, investigadores y profesionales, han adquirido interés por la reformulación o adición de productos funcionales, como exitosas estrategias para satisfacer las percepciones de los consumidores sobre la salubridad actual de los alimentos (Kaur and Sharma, 2019).

En años recientes, se ha puesto más atención en las funciones terciarias de los alimentos. Las funciones terciarias son los roles de los componentes o constituyentes de los alimentos en la prevención de enfermedades mediante la modulación de los sistemas fisiológicos. Como se mencionó anteriormente, debido al aumento en la preocupación por parte de los consumidores en el rol que cumplen los alimentos en la salud, las industrias alimentarias en muchos países del mundo están incrementando sus esfuerzos para desarrollar nuevos alimentos con funciones terciarias, también denominados “alimentos funcionales”. Importantes progresos se han realizado en el desarrollo de alimentos funcionales, basados en los resultados de estudios de los componentes de los alimentos que proveen beneficios en la salud.

La percepción más saludable de los productos cárnicos está relacionada, entre otras estrategias, con la adición de extractos de fibra (Bis-Souza *et al*., 2019b; Pérez-Burillo *et al*., 2019) y compuestos vegetales (Lucas-González *et al*., 2019), con la eliminación de grasas (Bis-Souza *et al*., 2020), o su sustitución por grasas insaturadas, con la reducción de aditivos e ingredientes asociados a trastornos de la salud (Cittadini *et al*., 2020; Inguglia *et al*., 2017; Rosmini *et al*., 2008), y a la incorporación de microorganismos que poseen capacidades probióticas *(Agüero et al*., 2020; Bis-Souza *et al*., 2019b; Pavli *et al*., 2020).

En los últimos años se han realizado numerosos estudios para desarrollar productos cárnicos funcionales, centrándose en estrategias para maximizar los compuestos promotores de la salud y reducir la presencia de aquellos que pueden causar impactos negativos en la salud del consumidor. Como tal, el uso de agentes prebióticos, probióticos y simbióticos en productos cárnicos ha aumentado considerablemente. Además, el uso de probióticos de nueva generación en productos cárnicos es un campo novedoso que puede explorarse. Con la actualización más reciente de paraprobióticos/postbióticos, se pudieron probar varios componentes en productos cárnicos. Algunos estudios de intervención que utilizan productos cárnicos a los que se les añaden agentes bióticos han

demostrado un gran potencial como alimentos funcionales al reducir la formación de compuestos nitrosos en el intestino y mejorar la funcionalidad de la microbiota intestinal. Aunque existen pocos estudios centrados en productos cárnicos simbióticos, los resultados también son muy prometedores en este campo (Manassi *et al*., 2022).

Los productos cárnicos fermentados pueden considerarse como una matriz relevante para la entrega de probióticos con posibles beneficios para la salud (Munekata et al., 2021b). Entre las muchas opciones actuales de cultivos iniciadores para productos cárnicos fermentados, la elección de microorganismos con beneficios adicionales para la salud ha ido ganando más atención entre los investigadores debido a los posibles beneficios para la salud asociados con estos microorganismos (Sirini *et al*., 2021).

El diseño y elaboración de productos cárnicos basados en el uso de las estrategias antes mencionadas ofrecería beneficios extra a los consumidores ya que se incluyen dentro del grupo de alimentos funcionales.

Este estudio tiene como objetivo evaluar la capacidad de bacterias probióticas para desarrollarse y mantener sus propiedades en matrices cárnicas crudo-curadas fermentadas y, al mismo tiempo, analizar el impacto generado en las características fisicoquímicas, microbiológicas y de aceptabilidad de embutidos crudos-curados, a partir de la modificación de una formulación tradicional mediante el uso de un cultivo iniciador comercial probiótico.

I.2. Hipótesis De Trabajo:

"Los microorganismos probióticos pueden adaptarse a las matrices cárnicas y actuar como iniciadores de embutidos crudos-curados, aportando beneficios en la salud del consumidor y aumentando el valor agregado del producto".

I.3. Objetivo General:

"Evaluar la capacidad de microorganismos probióticos para actuar como iniciadores, manteniendo sus capacidades probióticas en un embutido crudo-curado".

I.4. Objetivos Específicos:

- Evaluar características tecnológicas de bacterias probióticas para actuar como cultivo iniciador.

- Evaluar el riesgo toxigénico de bacterias probióticas.

- Evaluar la capacidad de antagonismo de bacterias probióticas frente a patógenos bacterianos.

- Evaluar la aceptabilidad del embutido crudo-curado elaborado con una cepa probiótica.

- Monitorear la viabilidad de la cepa y el mantenimiento de sus propiedades probióticas en el embutido crudo-curado.

CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. Productos cárnicos crudo-curados fermentados.

La fermentación y el secado pueden considerarse la forma más antigua de conservar las materias primas crudas. Mejorar la calidad y conservación de los alimentos mediante fermentación microbiana es una estrategia antigua que ha evolucionado para producir productos alimenticios fermentados funcionales modernos (Behera and Panda, 2020). Debido a la modernización de la industria alimentaria y al aumento del conocimiento sobre los productos cárnicos fermentados, el uso de cultivos iniciadores se convirtió en una estrategia relevante para mejorar el control de procesamiento y calidad (Laranjo *et al*., 2019; Sirini *et al*., 2021). Aunque el origen histórico de los productos cárnicos crudo-curados fermentados sigue siendo desconocido, muchos de estos productos han sido conocidos en Europa desde el siglo XIII al XIV después de ser introducido por Marco Polo. Los primeros humanos ciertamente eran conscientes del valor conservante de la sal y el secado y, por lo tanto, a lo largo de los siglos, los humanos pudieron desarrollar productos curados. La prueba de la producción de productos cárnicos crudo-curados fermentados se documentó por primera vez en la antigua Grecia, donde puede haber sido fomentada por las condiciones climáticas existentes. Los romanos heredaron esta tradición, y desde entonces, los productos cárnicos crudo-curados fermentados se extendieron a los países del centro, este y norte de Europa, así como a América y Australia, donde los productos cárnicos crudo-curados fermentados fueron reconocidos como herencia de los inmigrantes europeos (Vignolo *et al*., 2010). A pesar de la producción generalizada, Europa sigue siendo el principal productor y consumidor de estos productos cárnicos, contando con las cifras más altas de producción y consumo *per cápita* en Alemania, Italia, España y Francia. La producción en el Nuevo Mundo es mucho menor: en Estados Unidos, la producción anual de productos cárnicos crudo-curados fermentados es probablemente menos del 5% de la producción total de

estos productos (Vignolo *et al*., 2010). Los notables avances tecnológicos y las importantes mejoras en la higiene de la carne que ocurrieron hace unos 50 años se han capitalizado para el desarrollo de una gama de productos cárnicos crudo-curados fermentados en los que las diferencias entre países y regiones son el resultado de la disponibilidad de especies cárnicas, las condiciones ambientales y las tradiciones.

En nuestro país, el producto cárnico crudo-curado fermentado más comercializado es el salame, definido por el Código Alimentario Argentino (2023) como "*el embutido seco, elaborado sobre la base de carne de especies de consumo permitido, con el agregado de tocino, sal, salitre, especias, vino blanco y azúcar*". Otra manera de definirlo sería como una mezcla de carne magra y grasa, picadas, sal, nitrato y/o nitrito, azúcar y especias (mayormente orégano y pimienta negra), la cual es embutida dentro de una tripa en donde se produce un proceso de fermentación y luego se deja secar (Ammor and Mayo, 2007; Hugas and Monfort, 1997). La calidad del producto final está estrechamente relacionada con la maduración que tiene lugar durante el secado. Este proceso, que confiere al producto su capacidad particular de corte, firmeza, color y sabor, se caracteriza por una interacción compleja de reacciones químicas y físicas asociadas con el desarrollo microbiológico de la pasta (Ammor and Mayo, 2007; Ordoñez *et al*., 1999). La fermentación espontánea de los embutidos envuelve la participación de bacterias ácido lácticas (BAL), cocos coagulasa negativos (CCN; sobre todo especies de *Staphylococcus* y *Kocuria*), y, menos importante mohos y levaduras.

La estabilidad de los productos cárnicos fermentados se determina principalmente por una combinación de acidificación ocasionada por las BAL y la disminución de la actividad del agua (a_w) durante el curado y el secado. Además, se producen cambios bioquímicos y fisicoquímicos como resultado de las interacciones entre los microorganismos, la carne, la grasa y la tecnología de procesamiento, que es lo que produce la amplia gama de embutidos fermentados disponibles.

Elaboración de salames.

- Carne y grasa: Es preferible la carne de animales adultos, bien alimentados, debido a su mayor contenido de mioglobina, lo que favorece la formación de color estable. Aunque la carne utilizada depende de los hábitos alimentarios, costumbres y disponibilidad de especies animales en la región geográfica, se utiliza mayoritariamente carne de cerdo, a veces mezclada con carne de res o cordero. La carne de cerdo se usa en los países mediterráneos, ya que se prefiere el sabor y la apariencia de dichos productos, mientras que en Alemania no se considera que la adición de carne de res disminuya la calidad. Además, debido a la disponibilidad de carne (Argentina) y por motivos religiosos (países musulmanes), se utilizan carnes vacunas y ovinas en la formulación de salames. Las características de la carne, como la composición, el pH y las propiedades aglutinantes, son criterios importantes a la hora de seleccionar la carne para la producción de salames. La composición de la carne y la grasa es variable, dependiendo de la especie utilizada y de la región anatómica del animal. Aunque el porcentaje de grasa puede variar (10%- 40%), debe ser firme, blanca y fresca, con un alto punto de fusión y un bajo contenido en ácidos grasos poliinsaturados para evitar el enranciamiento y la exudación de grasa y para una apropiada superficie de corte de los salames (Lebert *et al*., 2007). Por regla general, la carne con un pH superior a 5,9 contiene niveles bajos de lactato y azúcar; el agua se retiene herméticamente, lo que da como resultado malas condiciones de unión y posible contaminación. La selección de carne que tenga cargas microbianas mínimas es fundamental ya que, si no, pueden introducirse riesgos de seguridad, sabores y texturas no deseadas. El número de bacterias en la carne debe ser inferior a 10^4 por gramo (Zdolec, 2017). Salmonella spp., *Campylobacter* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y las cepas verotoxigénicas de *Escherichia coli* son los patógenos más importantes en relación con los productos cárnicos y su ausencia en la materia prima es crucial para la producción de productos cárnicos seguros. Algunos de los patógenos mencionados anteriormente tienen la capacidad de sobrevivir en productos cárnicos con pH y actividad de agua (a_w) bajos y se deben aplicar estrategias de control efectivas

durante el procesamiento. Para la carne de res, el pH óptimo es de 5,4 a 5,5, mientras que la carne de cerdo generalmente se acidifica más rápido, con un pH final de 5,7 a 5,8. Deben evitarse la carne de cerdo PSE (pálida, blanda y exudativa) y el músculo de res DFD (seco, firme y oscuro) con pH > 6,2. Parásitos como *Trichinella espiralis*, *Cysticercus bovis* y *Toxoplasma gondii* pueden estar presentes en la carne. No crecen en los alimentos y por tanto el control se centra en destruir los parásitos y/o prevenir su introducción. Una cocción adecuada destruye los parásitos pero en este tipo de productos que no sufren ningún tratamiento térmico durante su elaboración, son peligros biológicos (Hui, 2012; Robertson *et al*., 2014). La relación carne:grasa es generalmente de 2:1 en la mezcla de la mayoría de los embutidos industriales, mientras que en el embutido tradicional esta relación es variable. La carne de res y cerdo son preferidas para productos del norte de Europa, mientras que la carne de cerdo parece ser más adecuada para la fabricación de productos mediterráneos (Demeyer, 2004).

- Aditivos y especias: El ingrediente más común utilizado en la producción de los productos cárnicos fermentados es el cloruro de sodio que ejerce un papel importante en la calidad (solubilización de proteínas miofibrilares y salinidad) y seguridad (reducción de la actividad del agua con la consiguiente inhibición del crecimiento microbiano) (Fraqueza *et al*., 2021). Normalmente, el NaCl se agrega en niveles que van del 2% al 4%, según la tecnología y las demandas del mercado (Honikel, 2008). La sal realiza muchas funciones, incluida la supresión del crecimiento microbiano (Barat and Toldrá, 2011), la reducción de la a_w, los efectos prooxidantes y, la liberación de proteínas solubles en sal, estas proteínas solubilizadas o gelatinosas se unen a las partículas de carne y grasa. El resultado es una estructura cada vez más firme con un secado y maduración continuos de los productos. Además, la sal da un sabor típico a los productos cárnicos (Zdolec, 2017). Otros aditivos importantes utilizados en el procesamiento de productos cárnicos fermentados son las sales de nitrato y nitrito. Estos componentes (en forma de nitrito residual) juegan un papel importante en el desarrollo de atributos sensoriales (color rojo oscuro característico y sabor curado), estabilidad oxidativa (inhibición de la oxidación de lípidos) y seguridad (inhibición de microorganismos

patógenos, especialmente las esporas de *Clostridium botulinum*) de embutidos fermentados (Munekata *et al*., 2021a). Se agregan nitritos y/o nitratos a un nivel de 150 a 250 ppm, según el producto cárnico y las reglamentaciones del país (Honikel, 2008). El nitrato de potasio (salitre) era el agente de curado original. El nitrato es muy estable y debe ser convertido en nitrito por las bacterias reductoras de nitrato (*Micrococcaceae*). Los nitritos añadidos a la carne o convertidos a partir de los nitratos experimentan reducciones químicas a NO a un pH de 5,4 a 5,5; este se une a la mioglobina de la carne para formar el NO termoestable, la mioglobina es responsable del típico color rojo curado de los salames (Honikel, 2008). El nitrito sigue siendo el agente de curado más eficaz para prevenir el deterioro de los alimentos y la contaminación bacteriana. Los nitritos se utilizan como potentes antimicrobianos (inhibición de *Clostridium botulinum*), contribuyen al color mediante la formación de nitrosilmioglobina, mejoran la estabilidad oxidativa de los lípidos y contribuyen al sabor típico de los productos cárnicos (Parthasarathy and Bryan, 2012). El uso de ascorbatos se ha convertido en una práctica común, siendo el objetivo principal la mejora de la estabilidad del pigmento rojo nitrosilado y la prevención de la oxidación lipídica (Balev *et al*., 2005). Los azúcares también se agregan comúnmente a los embutidos fermentados, entre los cuales los más utilizados son la dextrosa, la glucosa, la sacarosa y la lactosa, así como el jarabe de maíz y diferentes almidones (Rust, 2007). La función principal de los azúcares en los productos cárnicos fermentados es actuar como sustratos para que las BAL produzcan ácido láctico, lo que influye en la tasa de disminución del pH. La dextrosa y la glucosa promueven una tasa de acidificación más rápida en comparación con los disacáridos lactosa y sacarosa (Demeyer, 2004). Los productos fermentados de procesamiento corto generalmente se complementan con 0,5% a 0,7% de glucosa o sacarosa o 1% de lactosa, mientras que para productos de maduración prolongada, los niveles comunes son alrededor de 0,3% de glucosa o sacarosa o 0,5% de lactosa (Ruiz and Pérez-Palacios, 2014).

Las especias son sobre todo las que diferencian a los embutidos fermentados, influyen en el aroma de los productos cárnicos. La pimienta molida (0,2%- 0,3%) suele estar presente en todo tipo de embutidos, especialmente en los fermentados mediterráneos; también pueden contener altos niveles (1%- 3%) de paprika y/o ajo. La semilla de mostaza entera, el cilantro, el jengibre, el cardamomo, la nuez moscada y el clavo, entre otras especias, también se utilizan

en la formulación de salames. Las especias también demostraron actuar como antioxidantes efectivos, estimular la actividad de las BAL mediante el suministro de Mn e inhibir organismos indeseables (Vignolo *et al*., 2010). En los embutidos fermentados de producción industrial se incluyen también un número variable de otros aditivos, entre los que se añaden colorantes naturales (extractos de cochinilla y pimentón) y artificiales para mejorar la estabilidad del pigmento rojo curado (Vignolo *et al*., 2010). Para satisfacer las demandas de los consumidores de productos extremadamente sabrosos se utilizan potenciadores del sabor (ácidos glutámico y guanílico) y agentes saborizantes (hidrolizados de proteínas, hierbas y extractos de humo) (Vignolo *et al*., 2010). Para asegurar la gelificación de proteínas y fosfatos para que actúen como espesantes, humectantes y agentes gelificantes se adicionan a menudo cantidades variables (0,5%- 3%) de proteínas exógenas. Para una caída rápida del pH se pueden utilizar acidulantes químicos como el ácido láctico o cítrico o la glucono- delta lactona, aunque se pueden obtener diferentes sabores en los productos finales (Rust, 2007).

- Cultivos iniciadores: La necesidad de estandarización del proceso, así como de estrategias de aseguramiento de la calidad, tanto en las características organolépticas, como en la prevención del desarrollo de microorganismos no deseados, ha llevado al uso de cultivos iniciadores, superando así la necesidad de depender de la microbiota “interna” para el proceso de fermentación (Sirini *et al*., 2021; Vignolo *et al*., 2010). Los cultivos iniciadores de carne son preparaciones que contienen microorganismos activos o latentes que desarrollan la actividad metabólica deseada en la carne (Ammor and Mayo, 2007). Son usados para cambiar las propiedades sensoriales de los alimentos.

La mayoría de los cultivos iniciadores disponibles comercialmente contienen mezclas de BAL y CCN (Ammor and Mayo, 2007). La adición de microorganismos deseables a los productos cárnicos tienen diferentes propósitos, principalmente (1) mejorar la seguridad del producto mediante la inhibición de microorganismos patógenos, (2) mejorar la estabilidad del producto, extendiendo la vida útil del mismo por la inhibición de cambios indeseables producidos por microorganismos alterantes o reacciones abióticas, y (3) proveer diversidad en los productos a través

de la modificación de los materiales crudos para obtener nuevas propiedades sensoriales (Lücke, 2000).

En los productos cárnicos crudo-curados, las BAL, generalmente sirven a los propósitos 1-3, mientras que otros microorganismos, principalmente los CCN (*Staphylococcus*, *Kocuria*), levaduras (*Debaryomyces*) y hongos (*Penicillium*) normalmente brindan y estabilizan propiedades sensoriales deseadas (propósito 3) (Lücke, 2000).

Tecnología del procesamiento.

- Selección y picado de la carne.

En la producción de salames, se utiliza la carne de animales sanos, principalmente de cerdo y de res. La especie animal, la región anatómica del animal, la composición y la calidad microbiológica tienen una gran influencia en las características funcionales de la carne. La carne está representada por el tejido muscular miofibrilar, al cual se le han retirado el tejido conjuntivo y parte del tejido adiposo. La carne y la grasa se enfrían o se congelan y se trituran al tamaño de partícula deseado. La reducción de tamaño de partícula se puede hacer con una cutter (un conjunto de cuchillos que giran rápidamente en un recipiente que gira lentamente) o con una picadora de tornillo. El grado de picado depende del tipo de salame y puede variar de 2 a 5 mm para salames de trozos medianos y de 6 a 12 mm para salames picados en trozos grandes (Zdolec, 2017). La carne debe estar refrigerada o ligeramente congelada y la grasa debe congelarse para lograr un corte limpio y evitar que se manche.

- Mezclado y embutido.

Cuando solo se utiliza equipo para picar carne, después de moler la carne picada y la grasa se transfieren a una mezcladora para crear una masa de salame con todos los aditivos (sal, nitratos, nitritos, azúcares, cultivos iniciadores, especias, etc.).

Una vez picadas la carne y la grasa, se añaden sales de curado (NaCl, nitratos/nitritos), aditivos (ácido ascórbico, colorantes), otros ingredientes (azúcares, especias/hierbas aromáticas) y, a veces, cultivos iniciadores (bacterias BAL y/o CCN) a la masa de carne y se mezclan bien (Ordóñez and de la Hoz, 2007; Vignolo *et al*., 2010). Se debe mezclar bien para distribuir uniformemente los ingredientes. Después de mezclar bien, la mezcla debe introducirse inmediatamente en las tripas de envoltorio o mantenerse refrigerada y protegida del aire para permitir un desarrollo óptimo del color y la estabilización de la microbiota (Vignolo *et al*., 2010). Las tripas pueden ser naturales o artificiales, pero deben ser permeables al vapor de agua y al humo. Esta operación se lleva a cabo al vacío para excluir el oxígeno de la mezcla, evitar la decoloración de la carne, el desarrollo de sabores indeseables y la reducción de la vida útil del salame (Zdolec, 2017). Los diámetros de las tripas (y los salames) varían considerablemente; los diámetros pequeños (35- 40 mm) se utilizan generalmente para salames con moho para asegurar un suministro de oxígeno suficiente para el desarrollo completo del aroma (Spotti and Berni, 2007).

- Fermentación.

Los embutidos se colocan en cámaras de maduración. Durante la fermentación, el secado y la maduración, la temperatura, la velocidad del aire y la humedad relativa (HR) se ajustan y disminuyen gradualmente según el tipo de

salame a producir. Para los salames tradicionales se aplican, las condiciones naturales y menos controladas (Lebert *et al*., 2007). Las condiciones de fermentación varían en términos de temperatura y duración. En general, cuanto mayor sea la temperatura de fermentación, más rápida será la producción de ácido láctico. En Europa, la fermentación puede llevarse a cabo a temperaturas relativamente altas (18- 24°C) durante 1 a 2 días para salames alemanos e italianos, mientras que se ha informado de fermentaciones de 7 días para salames griegos, argentinos y ciertos italianos. La fermentación a temperaturas más bajas (10- 17°C) durante aproximadamente una semana se suele utilizar para los salames tradicionales franceses, españoles y portugueses (Vignolo *et al*., 2010).

Inmediatamente después del embutido, la temperatura del salame es inferior a cero grados. Se aconseja incluir un período de atemperado de tres horas a temperatura ambiente moderada antes de transferir los salames a la cámara de secado/maduración, para permitir la liberación de humedad de los salames e iniciar la fermentación. Una HR elevada al inicio del secado, que mantiene las tripas húmedas y suaves, y la disminución gradual de la humedad del aire en las etapas avanzadas del proceso son los factores clave para permitir la migración de la humedad desde el interior hacia la capa exterior del salame. En la primera fase de secado, el color rojo de la carne curada se acumula y el color de curado avanza desde el centro hacia la región exterior del salame.

Las temperaturas se mantienen inicialmente entre 22 y 24°C y se reducen lentamente a 18°C. La HR disminuye gradualmente desde valores típicos de 92-94% el primer día hasta 82- 84% y un movimiento de aire de 0,8- 0,5 m/s antes de que los salames se transfieran a la sala de maduración/almacenamiento (Zdolec, 2017). Si la humedad se mantiene demasiado alta, se retiene un exceso de humedad en la superficie, lo que generalmente resulta en un mayor crecimiento bacteriano en la superficie, formando así una capa viscosa. Si la humedad se reduce demasiado rápido, especialmente en las primeras etapas del proceso, se forma una costra dura y seca en la capa exterior del embutido. Esta costra no logra adaptarse al diámetro reductor causado por la pérdida continua de humedad y como resultado aparecerán grietas en el centro del producto (Heinz and Hautzinger, 2007).

- Secado o ahumado.

Después de la etapa de fermentación, los salames se secan al aire o se ahuman. Durante el secado, el agua se elimina de los salames en forma de vapor. La actividad de los microorganismos disminuye porque disminuye la porción de agua que pueden utilizar. Como resultado, la vida útil del producto aumenta, la masa y el volumen del producto disminuyen, la textura del producto será más dura y se desarrollarán compuestos aromáticos durante procesos más prolongados. El efecto de conservación del secado se consigue reduciendo la a_w en los salames. La presión del vapor de agua será constante en el espacio cerrado alrededor del material. Esta presión es menor o igual a la presión de vapor sobre el agua pura a la misma temperatura. La expresión numérica de esto es la a_w, y oscila entre 0,00 y 1,00. Los microorganismos tienen niveles óptimos y mínimos de a_w para el crecimiento y las bacterias Gram-negativas son generalmente más sensibles a una a_w baja que las bacterias Gram-positivas. Los microorganismos no pueden crecer por debajo de sus valores mínimos específicos (Zukál and Incze, 2010). Debido al a_w, que oscila entre 0,85 y 0,91, los salames fermentados en seco exhiben estabilidad en almacenamiento y pueden conservarse sin refrigeración. Los valores de a_w más bajos típicos de estos productos se logran secando al aire y ahumando (si se aplica) (Vignolo *et al*., 2010).

Durante la maduración, la temperatura se mantiene a <16°C con una humedad relativa del 75 al 78% para garantizar una fermentación bacteriana controlada y una deshidratación gradual, lo que da como resultado una reducción del valor del pH y del contenido de humedad en los salames terminados fermentados en seco. La duración del proceso de secado/maduración depende principalmente del diámetro de los salames y del tipo de azúcares y cultivos iniciadores utilizados (Heinz and Hautzinger, 2007). El control de la temperatura y la velocidad del aire juegan un papel importante en la seguridad alimentaria al inhibir el crecimiento de microorganismos no deseados, este control es necesario durante la maduración y el secado para una calidad constante. Como resultado de la reducción de a_w, los microorganismos menos resistentes desaparecen gradualmente, aunque los menos sensibles pueden sobrevivir durante un período

de tiempo más largo. En el producto final de los salames secos de larga maduración, la microbiota deteriorante prácticamente no tiene posibilidades de crecer y causar deterioro (Zdolec, 2017). La composición de los salames fermentados en seco cambia constantemente durante el proceso de maduración debido a reacciones bioquímicas complejas y se genera una amplia gama de compuestos. Los aminoácidos, aminas y ácidos grasos de cadena larga contribuyen al sabor y los ácidos grasos de cadena corta contribuyen al sabor y/u olor de los productos. Otros compuestos se convierten en sustancias aromáticas (aldehídos, cetonas, alcoholes secundarios). Todos estos compuestos son responsables del aroma del producto final. Pueden ser de diverso origen: algunos son resultado del metabolismo microbiano, algunos surgen de lipólisis y proteólisis endógena, otros de reacciones de óxido nítrico, autooxidación de lípidos y finalmente, algunos se originan a partir de especias (Zdolec, 2017).

El secado es una operación clave, la velocidad de secado debe ser lo más baja posible. Un aspecto crucial es evitar la coagulación superficial pronunciada de las proteínas de modo que se dificulte la difusión del agua desde el centro hacia el exterior. La cinética y la duración del secado varían según la temperatura y la velocidad del aire. Estos parámetros son menos importantes que para la etapa de fermentación y varían de 10 a 15°C durante 4 a 12 semanas para salames franceses, italianos, españoles, argentinos y griegos (Vignolo *et al*., 2010). Se informaron temperaturas de secado más altas (16- 18°C) para salames producidos en Grecia y Europa del Este, acompañadas de una maduración más corta. La HR durante la fermentación varía desde un mínimo de 63% a 75%, a valores máximos de 86% a 95%, lo que lleva a una a_w variable en salames tradicionales al final del secado (Lebert *et al*., 2007). Al comienzo del secado, la HR puede ser tan alta como 98%, lo que conduce a una colonización superficial distintiva por moho y levaduras. Se reportó que las levaduras son los organismos predominantes en la superficie (95%) durante las dos primeras semanas, y luego mohos y levaduras están presentes en cantidades iguales (Samelis *et al*., 1998). En la superficie de los salames, es deseable el crecimiento de moho, ya que previene el secado excesivo, protege de las reacciones oxidativas y contribuye al desarrollo del flavor (Spotti and Berni, 2007). La selección de cultivos iniciadores fúngicos entre los mohos naturales en la superficie de los salames permite el control del moho en las primeras etapas, haciendo que la presencia del iniciador sea predominante.

En los países del centro y norte de Europa, ahumar es una tecnología común. El humo es una mezcla compleja de componentes de alto y bajo peso molecular. Debido a su contenido en formaldehído y componentes fenólicos (Flores, 1997). El humo contribuye al efecto antimicrobiano y antioxidante, además de generar componentes específicos de sabor y color. La tecnología del ahumado ha experimentado una importante evolución en los últimos años; se han desarrollado cámaras de ahumado en las que se ha realizado una combustión controlada de la madera (300- 600°C) para minimizar la producción de hidrocarburos policíclicos (Vignolo *et al*., 2010). Los salames se ahúman desde varias horas hasta varias semanas dependiendo de su diámetro y del tipo de producto. El humo frío (temperatura inferior a 25°C) se aplica para impartir sabor, aroma y color a los productos cárnicos, así como para conservarlos. El método tradicional de ahumado directo todavía se utiliza hoy en día en la producción, pero en las últimas décadas, los aromas comerciales de humo de leña natural o humos líquidos se han vuelto más populares en todo el mundo como una forma conveniente y consistente de agregar sabor y color ahumado a los productos cárnicos sin usar un ahumadero. El humo de leña se genera mediante la combustión controlada de madera. Durante la pirólisis, la hemicelulosa se degrada más fácilmente, seguida de la celulosa y finalmente la lignina. La degradación de la hemicelulosa produce principalmente lactonas y furanos, mientras que la pirólisis de la celulosa produce ácidos alifáticos y aldehídos. La degradación térmica de la lignina da lugar a la clase más importante de compuestos de sabor a humo, los fenoles. Estos incluyen guaiacol, fenol, 4-metilguaiacol y siringol. La composición particular de los distintos tipos de madera es un factor importante que afecta la composición volátil del humo (Cadwallader, 2007). El humo puede contener algunos compuestos peligrosos para la salud, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, pero su contenido es muy variable y depende de muchos factores, como el método de ahumado, el tipo de generador de humo, el tipo de madera (Hitzel *et al*., 2013) y la temperatura del proceso. Se generan durante la pirólisis de la madera a temperaturas superiores a 500°C.

Seguridad en los salames: Los salames se consideran productos listos para el consumo, haciendo referencia a aquellos productos que no se someten a tratamientos térmicos antes de su consumo. Estos productos se vuelven estables y seguros a través de una secuencia de obstáculos, algunos de los cuales están incluidos específicamente (NaCl, $NaNO_2$/$NaNO_3$, ascorbato), mientras que otros se crean indirectamente en la mezcla embutida (bajo Eh, sustancias antagónicas, bajo a_w) (Vignolo *et al*., 2010). Por medio de estos obstáculos, se inhiben el deterioro y las bacterias que contaminan los alimentos, mientras que los organismos deseables, especialmente las BAL, apenas se ven afectados (Vignolo *et al*., 2010). Aparte de BAL, CCN, mohos y levaduras implicadas en la fermentación de los salames, la carne de res y cerdo (componentes principales de los salames) suelen contener microorganismos patógenos y, a menudo, están implicadas en la propagación de enfermedades transmitidas por los alimentos. Las materias primas (carne y tripas) son los principales vehículos de los patógenos y contaminantes transmitidos por los alimentos (Vignolo *et al*., 2010). El enfriamiento inhibe el crecimiento de ciertos patógenos, desde organismos mesófilos hasta psicrótrofos, y dado que la mayoría de los patógenos son mesófilos, la carne obtenida en buenas condiciones higiénicas presumiblemente no estaría implicada como riesgo sanitario. Incluso así, puede ocurrir el crecimiento de bacterias patógenas, superando los obstáculos naturales existentes. La intoxicación alimentaria por *Staphylococcus aureus*, Salmonella y *Clostridium* se ha relacionado tradicionalmente con los salames. Por otro lado, los patógenos emergentes dentro de los géneros *Campylobacter*, *Yersinia*, *Listeria monocytogenes* y *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) también han estado involucrados en brotes causados por salames (Vignolo *et al*., 2010). Las condiciones de los salames, los aditivos de curado y la presencia de cultivos iniciadores de BAL pueden actuar como obstáculos importantes para el control de estos patógenos. Sin embargo, no son suficientes para prevenir la supervivencia de *L. monocytogenes* o ECEH durante el proceso de fabricación. Un obstáculo adicional para reducir el riesgo de *L. monocytogenes* sería el uso de cultivos iniciadores productores de bacteriocinas o cultivos bioprotectores (Vignolo and Fadda, 2007). Las diferencias en la tecnología de producción de los salames influyen mucho en su seguridad, siendo el grado de secado y el tiempo de maduración las características más importantes. Los obstáculos que combinan una caída de pH/a_w, garantizarán la seguridad de los

productos (Vignolo *et al*., 2010). Durante la producción y el almacenamiento de embutidos fermentados, la carne sufre importantes cambios químicos, lo que lleva a la formación de compuestos biológicos nocivos, como hidrocarburos aromáticos policíclicos y productos de oxidación de lípidos (Vignolo *et al*., 2010).

II.2. Cultivos iniciadores.

El gran avance en el uso de cultivos iniciadores en los Estados Unidos se logró como resultado del trabajo de Deibel y Niven (1957), mientras que en Europa, los micrococos fueron introducidos como iniciadores por Niinivaara (1955) para prevenir defectos de color y sabor. Luego Nurmi (1966) desarrolló un cultivo mixto compuesto por lactobacilos y micrococos.

Los estudios sobre la ecología de los salames mostraron que las BAL, principalmente *Lactobacillus* y CCN representados por *Micrococcaceae*, son los dos principales grupos bacterianos tecnológicamente importantes en la fermentación y maduración de los embutidos (Palavecino Prpich *et al*., 2021; Pérez-Burillo *et al*., 2019; Vignolo *et al*., 2010). Durante la última década, la diversidad de BAL y CCN en embutidos fermentados tradicionales ha sido ampliamente investigada (Lebert *et al*., 2007). Las especies de BAL más comunes identificadas son *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* y *Lactobacillus plantarum*, con predominio de *L. sakei*. Entre los CCN, *Staphylococcus xylosus* y *Staphylococcus carnosus* son las especies más comunes identificadas a partir de productos tradicionales (Vignolo *et al*., 2010). También se han identificado a menudo pediococos y enterococos en salames (Vignolo *et al*., 2010). Los *Pediococcus* pueden garantizar una acidificación rápida y valores de pH más bajos en salames en los que crecen y metabolizan los carbohidratos a temperaturas más altas (Incze, 2007). La elección de *Pediococcus* o *Lactobacillus*, o la combinación de ambos, radica en las propiedades de crecimiento a distintas temperaturas. En el caso de los embutidos centro y norte europeos predomina el uso de *P. pentosaceus y L. plantarum,* debido a las elevadas temperaturas de fermentación.

En el caso de los *P. pentosaceus* pueden sobrevivir hasta una temperatura máxima de 48°C. En cuanto al *L. sakei y L. curvatus* tiene una temperatura óptima de crecimiento a 25°C. Entonces, se puede optar por cepas de acidificación suave (fermentación a baja temperatura) correspondientes a los embutidos mediterráneos, o cepas de acidificación acelerada (fermentación a alta temperatura) similar a los embutidos centroeuropeos.

La primera producción de salames se basó en la fermentación espontánea debido al desarrollo de la microbiota naturalmente presente en la materia prima. Las BAL autóctonas generalmente presentes en la carne cruda en cantidades bajas (10^2- 10^3 UFC/g) dominan rápidamente la fermentación, el NaCl, nitrato/nitrito y un entorno anaeróbico favorece el crecimiento y establecimiento de las BAL en el ecosistema de fermentación de la carne (Vignolo *et al*., 2010). Durante este proceso, dos reacciones microbiológicas básicas ocurren de forma simultánea e interdependiente: una disminución en el pH de la pasta de carne a través de la glucólisis por BAL y la producción de óxido nítrico por CCN a través de la reducción de nitrato/nitrito. A través de la producción de ácido, las BAL son responsables del sabor “ácido” de los salames (Demeyer, 2004). La acidificación también induce la desnaturalización y coagulación de las proteínas de la carne que, junto con el proceso de secado, favorecen el desarrollo de la textura del embutido (Barbut, 2007). Durante la maduración, la degradación de las proteínas de la carne se lleva a cabo por enzimas endógenas y bacterianas. Se ha demostrado que *L. sakei* y *L. curvatus* aisladas de carne poseen actividad proteolítica sobre proteínas musculares y juegan un papel importante en la generación de aminoácidos (Vignolo *et al*., 2010). Por otro lado, los organismos CCN, en particular *Staphylococcus*, contribuyen al sabor mediante la catabolización de aminoácidos y ácidos grasos libres y la producción de una variedad de compuestos volátiles que mejoran el aroma de la carne curada y desempeñan un papel en la formación del color a través de su nitrato reductasa (Vignolo *et al*., 2010).

También participan levaduras (*Debaryomyces*) (Zdolec, 2017) y hongos (*Penicillium*) (Tabanelli *et al*., 2012) denominados cultivos de superficie. Los mismos son agregados antes o después del estufado, ya sea por aspersión o por inmersión. Esto permite una cobertura homogénea del producto, logrando un emplumado aceptable. Estos hongos tienen la función de estandarizar la cobertura del salame, evitar la presencia de hongos extraños toxigénicos, proteger al

producto de la desecación y la oxidación (Palavecino Prpich *et al*., 2021), sumado a que aportan aromas característicos, a la vez que generan un efecto buffer mediante la producción de amoníaco. También contribuyen al sabor a través de actividades lipolíticas y proteolíticas y la degradación del ácido láctico (Palavecino Prpich *et al*., 2021; Vignolo *et al*., 2010).

Desde el punto de vista de la seguridad, se ha informado ampliamente sobre el uso de BAL bacteriocinogénicas como cultivos bioprotectores para controlar de forma natural la vida útil y la seguridad de los productos cárnicos fermentados (Castellano *et al*., 2008; Vignolo and Fadda, 2007).

Los cultivos iniciadores pueden estar asociados con posibles factores de riesgo, como la producción de aminas biogénicas, la presencia de genes adquiridos de resistencia antimicrobiana y la producción de enterotoxinas (Cocconcelli, 2007; Vidal-Carou *et al*., 2014).

Con miras a la elección de cultivos iniciadores para embutidos fermentados, se deben seleccionar cepas BAL, CCN y hongos con actividades metabólicas útiles y beneficios durante la fermentación de embutidos (Tabla 1). Aunque estos requisitos pueden cumplirse, las características finales del producto que determinan la singularidad del mismo dependerán en gran medida de las cepas involucradas. Durante las últimas décadas, el uso de cultivos iniciadores comerciales en la fermentación del salame ha llevado a la estabilización del proceso y la reducción de la variabilidad del producto, provocando una pérdida de la biodiversidad bacteriana. Los cultivos puros aislados de salames tradicionales exhiben una diversidad de actividades metabólicas que difieren fuertemente de los iniciadores industriales a granel. A menudo dependen más de sus propias capacidades biosintéticas y albergan más enzimas convertidoras de aminoácidos que desempeñan un papel clave en las características de sabor de los productos tradicionales (Leroy and De Vuyst, 2004). Existe una tendencia reciente en el aislamiento de cepas de tipo silvestre para usarlas como cultivos iniciadores autóctonos hacia la mejora de la seguridad y la preservación de las cualidades sensoriales típicas. El aislamiento y selección de estas cepas silvestres es de gran interés para estandarizar la calidad y limitar la formación de compuestos inseguros mientras se preserva la especificidad del producto (Palavecino Prpich *et al*., 2021; Vignolo *et al*., 2010). Además, la selección de cultivos iniciadores apropiados y microbiota autóctona de

los pequeños productores sería una forma de mejorar la seguridad sin afectar su tipicidad (Vignolo *et al*., 2010).

Tabla 1. Requisitos de las cepas BAL, CCN, levaduras y hongos para ser utilizadas como cultivos iniciadores para salames.

Grupo microbiano	Actividad metabólica	Beneficios durante la fermentación de salames
LAB	Acidificación	Modulación del sabor ácido/picante
		Inhibición de patógenos y contaminantes
		Desarrollo de textura
		Aceleración de la formación del color y secado
	Homofermentativas	No productoras de gas
	Crecer a diferentes temperaturas, concentraciones de sal y pHs	Competencia con la microbiota nativa de la materia prima
	Actividad proteolítica y lipolítica	Desarrollo del flavor (sabor de compuestos no volátiles)
	Nitrato y nitrito reductasas	Formación de nitrosomyoglobina
	Actividad antimicrobiana (bacteriocinas)	Inhibición de patógenos y contaminantes
		Extensión de la vida útil
	Actividad antioxidante (producción de catalasa)	Protección del color
	Tolerancia a microorganismos que formen parte del cultivo iniciador	Cultivo iniciador mixto
CCN	Actividad nitrato reductasa	Formación del color rojo típico de curado
		Eliminación del exceso de nitrato
	Actividad antioxidante (producción de superóxido dismutasa y catalasa)	Protección del color
		Previene la oxidación de lípidos
	Catabolismo de aminoácidos y ácidos grasos libres	Desarrollo del flavor (compuestos aromáticos volátiles)
Levaduras y hongos	Actividad antioxidante	Previene rancidez
		Mejora el color
	Actividad proteolítica y lipolítica	Desarrollo del flavor

II.3. Alimentos funcionales.

En las últimas décadas las demandas de los consumidores en el ámbito de la producción de alimentos han cambiado notablemente, cada vez se cree más que

los alimentos contribuyen directamente a su salud. Hoy con los alimentos no se pretende solamente satisfacer el hambre y proveer nutrientes, si no también, prevenir enfermedades relacionadas con la nutrición y mejorar el bienestar físico y mental. El conocimiento de la influencia de la dieta en la salud y el bienestar ha aumentado considerablemente, lo que ha llevado a diseñar alimentos nuevos y más saludables que reducen el riesgo de varias enfermedades crónicas. Los alimentos así diseñados se denominan alimentos funcionales, que son alimentos tradicionales modificados de tal manera que tienen beneficios para la salud en comparación con los productos no modificados.

El término alimento funcional se introdujo por primera vez en Japón en la década de 1980 y se refiere a alimentos procesados que contienen ingredientes que ayudan a funciones corporales específicas además de ser nutritivos. Hasta la fecha, Japón es el único país que ha formulado un proceso de aprobación regulatorio específico para alimentos funcionales. Los japoneses acuñaron el término Foods for Specific Health Use o FOSHU, al que se le ha agregado un ingrediente funcional para un efecto saludable específico (Berry, 2002). Existen organismos estatales que determinan las especificaciones para que un producto alimentario pueda ser denominado como FOSHU.

Granato *et al*. (2017) definieron a los alimentos funcionales como alimentos procesados industrialmente o naturales que, cuando se consumen regularmente dentro de un una dieta variada a niveles eficaces tiene efectos potencialmente positivos en la salud más allá de la nutrición básica. Puede ser un alimento natural, un alimento al que se ha añadido, eliminado o modificado un componente, un alimento en el que se ha modificado la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes o una combinación de cualquiera de estas posibilidades. Junto con la definición de alimentos funcionales, los principales criterios de inclusión para declarar funcional a un ingrediente o alimento en una etiqueta alimentaria son la inocuidad de los alimentos, el libre acceso sin necesidad de prescripción médica (o consejo médico) y la evidencia de beneficios para la salud cuando es consumido regularmente en una dieta equilibrada (Granato *et al*., 2020).

La función terciaria de los alimentos funcionales está implicada en la modulación de los sistemas fisiológicos de los organismos vivos, como el sistema inmune, endócrino, nervioso, circulatorio y digestivo, incluyendo efectos positivos en la salud, como, por ejemplo, disminución de la presión sanguínea, reducción de

los niveles de colesterol plasmático, mejoría de la microbiota y del funcionamiento intestinal entre otros. A continuación, se citan ejemplos de alimentos modificados para obtener un alimento funcional.

Se ha estudiado la eliminación de componentes de los productos crudos-curados tradicionales, como lo son las sales de cura (nitratos y nitritos de sodio), por su efecto nocivo para la salud al ser consumido en exceso (Jiménez-Colmenero *et al*., 2010).

Aumentando la concentración de un componente deseado como lo son las BAL, mejorando las características organolépticas y la disminución del pH (Bedia *et al*., 2011).

Utilizando microorganismos beneficiosos para fermentar un producto cárnico crudo-curado (Erkkilä *et al*., 2001b).

Reemplazando un componente nocivo por otro benéfico, por ejemplo el reemplazo parcial o total de grasa por utilización de fibra (Zhang *et al*., 2010).

II.4. Utilización de microorganismos probióticos.

Durante las últimas décadas el progreso de los microorganismos probióticos ha marcado un importante avance en la industria alimentaria y esto se traslada hacia el desarrollo de alimentos funcionales. El término probiótico, popularizado por R. Fuller en 1989, se define como microorganismos vivos que ingeridos en cantidades adecuadas inducen beneficios para la salud en el huésped (Granato *et al*., 2020). Se estima que se debe consumir al menos 10^6 UFC/g de células vivas para que ejerza su efecto (Stavropoulou and Bezirtzoglou, 2020). Se utilizan como probióticos microorganismos de muchos géneros diferentes, pero *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son los principales. Estos géneros bacterianos se encuentran aislados del intestino humano en poblaciones considerables (Stavropoulou and Bezirtzoglou, 2020). *Lactobacillus* incluye diferentes especies con preponderancia como probióticos de *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. bulgaricus*, *L. reuteri*, *L. casei*, *L. johnsonii* y *L. pantarum*. Estas cepas son tolerantes a la acidez estomacal y

tienen una buena capacidad de adherencia a las células intestinales. *Bifidobacterium* pertenece al filo de las Actinobacterias ya que tienen una morfología ramificada característica. Las especies probióticas de *Bifidobacterium* más comunes son *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum*.

Streptococcus thermophilus, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus* y varios bacilos, así como las levaduras *Saccharomyces boulardii* y *Saccharomyces cerevisiae* también muestran algunas propiedades probióticas.

Los microorganismos probióticos forman parte de nuestra microbiota intestinal, pero también se pueden encontrar en otros ambientes ecológicos. Sin embargo, debe quedar claro que las propiedades probióticas están relacionadas con la cepa e incluso dependen del tejido. Así, el efecto probiótico no es universal para todas las especies bacterianas ni para todos los tejidos humanos (Stavropoulou and Bezirtzoglou, 2020).

Metchnikoff (1908) realizó las primeras investigaciones sobre las BAL y sus efectos sobre la salud en los seres humanos, y los resultados de estas primeras investigaciones sugirieron que la ingestión de BAL mejoraba la salud del huésped. Las BAL son un grupo heterogéneo de microorganismos que a menudo están presentes en el intestino humano y se introducen a través de la ingestión de alimentos fermentados, como yogur y otros productos lácteos fermentados, varios quesos y productos cárnicos fermentados. Las bifidobacterias y las cepas de BAL se incluyen en muchos alimentos funcionales y suplementos dietéticos (Plaza-Diaz *et al*., 2019).

La elección de qué microorganismo usar como probiótico está determinada por muchos factores diferentes (Tabla 2). Para sobrevivir al paso por el tracto gastrointestinal, es importante que los microorganismos tengan resistencia al pH bajo del estómago, la bilis del intestino, las enzimas gástricas y pancreáticas. La adhesión a la mucosa intestinal, la coagregación y autoagregación, se consideran importantes para la modulación inmunitaria (el intestino es el órgano inmunitario más grande del cuerpo), la exclusión de patógenos, la protección de la mucosa dañada y la colonización transitoria prolongada. Se considera que el origen humano es importante para las interacciones específicas del huésped con el probiótico. Los microorganismos administrados obviamente deberían ser seguros. Finalmente, los probióticos potenciales deben tener buenas propiedades tecnológicas para que puedan ser cultivados a gran escala, tengan una vida útil

aceptable y, en caso de aplicación en productos fermentados, contribuyan a un buen sabor (Ouwehand *et al*., 2002).

Durante los últimos años los probióticos ganaron la atención de los médicos por su uso en la prevención y tratamiento de múltiples enfermedades. Los principales mecanismos de acción de los probióticos incluyen desde la producción de bacteriocinas y ácidos grasos de cadena corta, la reducción del pH intestinal y la competencia por nutrientes, antagonismo directo contra patógenos, inhibición de la adherencia bacteriana de patógenos y capacidad de invasión en el epitelio intestinal, hasta una mejora en la función de la barrera mucosa y la inmunomodulación. Existe evidencia de que los probióticos influyen en varios aspectos de la respuesta inmune innata y adquirida al inducir la fagocitosis, la secreción de Ig A y modificar las respuestas de las células T (Kechagia *et al*., 2013). También se acepta que existe una comunicación mutua entre la microbiota intestinal y el hígado, el denominado “eje microbiota-intestino-hígado”, así como una comunicación recíproca entre la microbiota intestinal y el sistema nervioso central a través del “eje microbiota-intestino-cerebro” (Stavropoulou and Bezirtzoglou, 2020). Además, recientemente, el “eje intestino-pulmón” en las infecciones bacterianas y virales se discute considerablemente, ya que la microbiota intestinal amplifica la actividad de los macrófagos alveolares y tiene un papel protector en la defensa del huésped contra la neumonía (Stavropoulou and Bezirtzoglou, 2020). Se ha demostrado que los probióticos reducen el colesterol sérico, previenen el cáncer y mejoran el curso de los trastornos digestivos, como la intolerancia a la lactosa, la diarrea aguda, nosocomial y asociada a antibióticos; trastornos alérgicos tales como dermatitis atópica (eccema) y rinitis alérgica en lactantes; la diarrea asociada a *Clostridium difficile* y algunos trastornos inflamatorios intestinales en adultos (Plaza-Diaz *et al*., 2019). Además, los probióticos pueden ser de interés como coadyuvantes en el tratamiento de trastornos metabólicos, como la obesidad, el síndrome metabólico, la enfermedad del hígado graso no alcohólico y la diabetes tipo 2 (Plaza-Diaz *et al*., 2019). Se reconoce la importancia de la microbiota intestinal humana equilibrada en la preservación de la salud. Los estados de enfermedad tales como infecciones, condiciones autoinmunes, alergias y otros pueden ocurrir cuando se altera el equilibrio intestinal. Los probióticos parecen ser un enfoque prometedor para prevenir e incluso reducir los síntomas de tales estados clínicos como terapia

adyuvante al preservar el equilibrio de la microbiota intestinal normal y mejorar el sistema inmunológico.

La gama de productos alimenticios que contienen cepas probióticas es amplia y sigue creciendo. Los principales productos existentes en el mercado son los de base láctea que incluyen leches, leches fermentadas, quesos, helados, y yogures, siendo estos últimos los que concentran la mayor parte de las ventas. Las aplicaciones de alimentos no lácteos incluyen productos a base de soja, barras nutritivas, cereales y una variedad de jugos (Kechagia *et al*., 2013). Otras matrices alimenticias como los productos cárnicos fermentados están siendo experimentadas (Erkkilä *et al*., 2001a; Erkkilä *et al*., 2001b; Pavli *et al*., 2020; Pérez-Burillo *et al*., 2019; Pidcock *et al*., 2002; Rubio *et al*., 2013; Ruiz-Moyano *et al*., 2008; Ruiz-Moyano *et al*., 2011; Sayas-Barberá *et al*., 2012). Los factores que deben ser tenidos en cuenta en la evaluación de la efectividad de la incorporación de las cepas probióticas en dichos productos son, además de la seguridad, la compatibilidad del producto con el microorganismo y el mantenimiento de su viabilidad a través de las condiciones de procesamiento, empaque y almacenamiento de los alimentos.

Tabla 2. Principales propiedades de los microorganismos probióticos.

Propiedad	Beneficio
Resistencia a ácido, bilis, enzimas gástricas y pancreáticas	Supervivencia al pasaje a través del tracto gastrointestinal
Adhesión a la mucosa gastrointestinal, autoagregación y coagregación	Inmunomodulación
	Exclusión competitiva de patógenos
	Prevención de adhesión y colonización de patógenos
	Protección de la mucosa dañada
	Colonización transitoria prolongada
Producción de sustancias antimicrobianas	Actividad antimicrobiana contra patógenos
Origen humano	Interacción especie específica con el hospedador
Efectos beneficios documentados	Los efectos sobre la salud propuestos son verdaderos
Seguros	Ausencia de factores de virulencia
	Baja resistencia a antibióticos
	No productores de enterotoxinas
Buenas propiedades tecnológicas	Estabilidad de la cepa
	Producción a gran escala
	Colonización de la masa cárnica
	Generación de cambios fisicoquímicos, de textura y sensoriales esperados
	Tolerancia al oxígeno

II.5. Productos cárnicos fermentados con probióticos.

La tendencia actual es el desarrollo de nuevos productos alimenticios, que promuevan la salud humana y el bienestar de los consumidores, estos son llamados alimentos funcionales. Los alimentos probióticos se encuentran dentro de este grupo y poseen gran interés comercial y mercados en expansión. Además de su uso común en la industria láctea, las cepas probióticas pueden usarse en otros productos alimenticios, incluidas las carnes fermentadas (Bis-Souza *et al*., 2019a; De Vuyst *et al*., 2008) y es considerada como una de las principales estrategias para producir productos cárnicos funcionales (Munekata *et al*., 2022).

Mejorar la calidad y la conservación de los alimentos mediante la fermentación microbiana es una estrategia antigua que ha evolucionado para producir productos alimenticios fermentados funcionales modernos (Behera and Panda, 2020).

Tradicionalmente, los alimentos fermentados se han producido utilizando prácticas que se basan en la exposición y el consiguiente crecimiento de microorganismos autóctonos/endógenos que modifican la composición de los alimentos (Kumar *et al*., 2017). En el caso de los productos cárnicos, el crecimiento microbiano afecta gradualmente las propiedades fisicoquímicas, de textura, sensoriales y funcionales de la masa cárnica, lo que conduce a productos con color, sabor y aroma apreciados que pueden almacenarse por largos períodos de tiempo (Kumar *et al*., 2017).

Debido a la modernización de la industria alimentaria y al aumento del conocimiento sobre los productos cárnicos fermentados, el uso de cultivos iniciadores se convirtió en una estrategia relevante para mejorar el control del procesamiento y la calidad (Laranjo *et a*l., 2019). Entre las muchas opciones actuales de cultivos iniciadores para productos cárnicos fermentados, la elección de microorganismos probióticos, ha ganado más atención entre los investigadores debido a los posibles beneficios para la salud asociados con estos microorganismos (Bis-Souza *et al*., 2019a; Sirini *et al*., 2021).

El uso de productos cárnicos como portadores de probióticos es una opción interesante para producir alimentos fermentados funcionales (Bis-Souza *et al*., 2019a). Los productos cárnicos fermentados generalmente no se calientan o solo se calientan levemente, lo cual es adecuado para el transporte de bacterias probióticas (Ammor and Mayo, 2007; Arihara, 2006; Kołożyn-Krajewska and Dolatowski, 2012; Munekata *et al*., 2022). Además, hay razones para creer que la matriz de estos productos protege la supervivencia de los probióticos a través del tracto gastrointestinal (Bis-Souza *et al*., 2019a; De Vuyst *et al*., 2008; Khan *et al*., 2011; Kołożyn-Krajewska and Dolatowski, 2012; Zhang *et al*., 2010; Žugić Petrović *et al*., 2019). Sin embargo, debe tenerse en cuenta el potencial impacto negativo del entorno de los productos cárnicos fermentados sobre la viabilidad celular, en particular con respecto a su alto contenido en sal de curado y su bajo pH y baja actividad de agua debido a la acidificación y el secado (De Vuyst *et al*., 2008; Khan *et al*., 2011; Kołożyn-Krajewska and Dolatowski, 2012). En general, la viabilidad celular en un entorno de carne fermentada probablemente dependerá de la cepa (De Vuyst *et al*., 2008; Kołożyn-Krajewska and Dolatowski, 2012). Por lo tanto, será importante la elección de microorganismos apropiados para ser aplicados como cepas probióticas en una matriz de carne fermentada (De Vuyst *et al*., 2008;

Kołożyn-Krajewska and Dolatowski, 2012). Una posibilidad es el uso de bacterias que se asocian comúnmente con el ambiente de la carne y que poseen los requisitos fisiológicos apropiados y propiedades que promueven la salud (De Vuyst *et al*., 2008; Khan *et al*., 2011; Kołożyn-Krajewska and Dolatowski, 2012). Dichas bacterias pueden obtenerse analizando aislados de embutidos naturales o cultivos iniciadores de carnes comerciales existentes en busca de propiedades probióticas (De Macedo *et al*., 2012; De Vuyst *et al*., 2008; Kołożyn-Krajewska and Dolatowski, 2012; Leroy *et al*., 2006). Se han obtenido así varias cepas candidatas (Borah *et al*., 2016; Erkkilä and Petäjä, 2000; Moreno *et al*., 2018; Papamanoli *et al*., 2003; Pennacchia *et al*., 2006; Pennacchia *et al*., 2004; Zommiti *et al*., 2018). Alternativamente, el desempeño de las cepas con propiedades promotoras de la salud documentadas, puede investigarse en un entorno de carne fermentada (De Vuyst *et al*., 2008; Khan *et al*., 2011; Kołożyn-Krajewska and Dolatowski, 2012; Leroy *et al*., 2006). Por lo tanto, deben ser capaces de sobrevivir al proceso de fermentación y secado, así como a las condiciones de refrigeración y almacenamiento y, preferentemente, ser capaces de crecer hasta un número que permita la exhibición de efectos que promueven la salud (Bis-Souza *et al*., 2019a; De Vuyst *et al*., 2008; Kołożyn-Krajewska and Dolatowski, 2012; Leroy *et al*., 2006). De esta forma, se ha demostrado que varias cepas probióticas sobreviven al proceso de fabricación de productos cárnicos fermentados y pueden detectarse en gran número en el producto final (Arihara *et al*., 1998; Erkkilä *et al*., 2001a; Erkkilä *et al*., 2001b; Pavli *et al*., 2020; Ruiz-Moyano *et al*., 2011; Sameshima *et al*., 1998; Sirini *et al*., 2021).

La mayoría de las investigaciones que involucran probióticos en productos cárnicos se centran en la supervivencia de las especies probióticas en la matriz cárnica y su influencia en las características tecnológicas y sensoriales del producto final. Pocos estudios reportan los efectos del consumo de estos productos en la salud del huésped (De Macedo *et al*., 2012; Sirini *et al*., 2021). Esta condición se debe principalmente a que las pruebas *in vivo* son costosas, requieren más tiempo para la experimentación y la aprobación de los comités de ética (Pan *et al*., 2009). Solo después de estos estudios será posible confirmar el valor intrínseco de los productos cárnicos fermentados y contribuir al reconocimiento de dichos productos como alimentos funcionales.

El primer paso requerido en el proceso de desarrollo de alimentos probióticos es la identificación y caracterización de la cepa probiótica. Otros pasos incluyen la investigación de las características fisiológicas y los requisitos tecnológicos, el desciframiento de los mecanismos de acción y la demostración de los beneficios en los humanos (Bis-Souza *et al*., 2019a; De Vuyst *et al*., 2008).

Además de contribuir a la salud humana, los productos cárnicos fermentados con probióticos deben tener suficiente valor comercial. Por lo tanto, es un requisito principal, la evaluación de los aspectos sensoriales y tecnológicos del producto final (Bis-Souza *et al*., 2019a; De Vuyst *et al*., 2008; Khan *et al*., 2011; Leroy *et al*., 2006).

La adición de probióticos a los productos cárnicos fermentados (principalmente salames) puede verse como una opción para el desarrollo de alimentos funcionales, que promuevan los beneficios para la salud asociados con las BAL y contribuyan al aumento del consumo de dichos productos (De Macedo *et al*., 2012; De Vuyst *et al*., 2008; Žugić Petrović *et al*., 2019). Aún quedan desafíos por abordar, ya que la evidencia científica que respalda los beneficios funcionales de los productos cárnicos probióticos es limitada y ha ido creciendo a un ritmo más lento que otros productos alimenticios y también se ha cuestionado la salubridad de estos productos en cuanto a su alto contenido de sal, nitritos y grasa (Munekata *et al*., 2022).

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Muestras.

Los microorganismos utilizados en los ensayos se listan en la Tabla 3. Las cepas probióticas pertenecen al Instituto Rosell Lalleman (Canadá), DuPont (U.S.A), Yakult (Japón), Universidad Autónoma Metropolitana (México) y BioGaia (Suecia). *Pediococcus pentosaceus* PCFF-1 (aislado desde Bactoferm F1-100), *Staphylococcus xylosus* DD-34 y *Penicillium nalgiovense* MOLD-600 fueron adquiridos mediante un proveedor de Chr. Hansen® (Dinamarca). *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* fueron gentilmente provistas por el Hospital Pediátrico del Niño Jesús (Córdoba, Argentina). *Escherichia coli* y Salmonella dublin pertenecen a la colección de cepas de la Universidad Nacional del Litoral (Departamento de Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias, Esperanza, Santa Fe, Argentina). En algunos ensayos se incluyeron cepas de *L. plantarum* Lp-UCC y *L. sakei* Ls-UCC aisladas desde la microbiota indígena de salames (Córdoba, Argentina). Los efectos beneficiosos de las cepas probióticas han sido documentados en los siguientes trabajos: *L. rhamnosus* R0011 y *L. helveticus* R0052 por Evans *et al*. (2016); *Lactobacillus rhamnosus* Lr-32 por Vale y Mayer (2021); *L. paracasei* Lpc-37 por Ouwehand *et al*. (2014); *Lactobacillus casei shirota* por Tripolt *et al*. (2015); *Enterococcus faecium* MXVK29 por Manassi *et al*. (2022); *Lactobacillus reuteri* DSM17938 por Savino *et al*. (2018) y *L. reuteri* DSM17918 por Lin *et al*. (2018).

L. helveticus R0052 y *L. rhamnosus* R0011. Las cepas han sido evaluadas en cuanto a seguridad y mecanismos de acción probiótica *in vitro*, en modelos animales y en ensayos clínicos en humanos. Las cepas se adhirieron a las células epiteliales humanas, ayudaron a mantener la función de barrera y bloquearon la adhesión de varios patógenos, lo que permitió su eliminación del intestino. Las cepas también provocaron una respuesta antiinflamatoria al regular negativamente IL-1β, IL-8 y TNF-α. En varios modelos de estrés, la combinación de probióticos

facilitó un mejor funcionamiento y resultados que pueden deberse al mantenimiento de la función de barrera y la supresión de la inflamación. En general, los estudios preclínicos sugieren un posible papel antiinfeccioso de las cepas. Los estudios clínicos, principalmente en niños, han identificado a estas cepas como un suplemento eficaz para diversas enfermedades gastrointestinales, como la diarrea asociada a antibióticos y la gastroenteritis aguda. Investigaciones recientes también han indicado que esta combinación puede ser beneficiosa para personas con dermatitis atópica o disbacteriosis vaginal (Foster *et al*., 2011).

L. ramnosus R0011. Mantiene la barrera intestinal. Incrementa la expresión de mucina en la barrera intestinal. Reduce reacciones proinflamatorias. Previene infecciones de ciertos patógenos (Ficha técnica).

L. helveticus R0052. Mantiene la barrera intestinal. Compite con patógenos por la adhesión a las células epiteliales, inhibe la adhesión de patógenos a las células epiteliales gracias a la capa de proteínas. Previene la infección de patógenos tales como *E. coli* y *H. pillory* que puede tener actividad antimicrobiana no debido exclusivamente a la producción de ácidos. Activa las células inmunitarias y modula la producción de anticuerpos (ficha técnica).

L. rhamnosus Lr-32. Resistencia a ácido y bilis. Resistencia a la pepsina y a la pancreatina. Adhesión a la mucosa intestinal. Inhibición a patógenos (Salmonella typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*). Inmunomodulación (ficha técnica).

L. paracasei Lpc-37. Los estudios *in vitro* muestran que es capaz de resistir el paso por el estómago, ya que la supervivencia es cercana al 90%; además la supervivencia a ácidos y sales biliares es de casi un 60%. En los estudios *in vitro L. paracasei* Lpc-37 mostró una fuerte adhesión a las células epiteliales. Está científicamente demostrado que *L. paracasei* Lpc-37 es capaz de equilibrar y regenerar la microbiota intestinal durante y después de un tratamiento con antibióticos. Además, es capaz de mantener el equilibrio intestinal en niveles significativamente más altos en el grupo de estudio respecto al placebo, dos semanas después de la finalización del tratamiento con antibióticos (Ficha técnica).

L. casei Shirota. Efecto modesto pero significativo sobre los síntomas del síndrome del intestino irritable (Thijssen *et al*., 2016). El consumo diario de leche fermentada que contiene *L. casei* Shirota redujo la incidencia de heces duras o grumosas (Sakai *et al*., 2011). El tratamiento de la osteoartritis de rodilla es un

desafío debido a la ineficacia y los efectos adversos de los medicamentos actuales. Se ha demostrado que el tratamiento con probióticos promueve el metabolismo óseo, reduce el dolor y las respuestas inflamatorias de los trastornos musculoesqueléticos relacionados con la edad, incluida la osteoartritis. El resultado secundario se definió como cambios en los niveles séricos de proteína C reactiva de alta sensibilidad. El consumo de *L. casei* Shirota podría servir como una nueva opción terapéutica en el tratamiento clínico de la osteoartritis de rodilla, mejorando el resultado del tratamiento probablemente mediante la reducción de los niveles séricos de hs-CRP (Lei *et al*., 2017). El riesgo de desarrollar hipertensión es sustancialmente menor en personas mayores que toman productos lácteos fermentados que contienen *L. casei* Shirota al menos 3 veces por semana (Aoyagi *et al*., 2016).

E. faecium MXVK29. La caracterización de una sustancia inhibidora producida por *E. faecium* MXVK29 podría considerarse como un conservante alimentario natural. Esta bacteriocina mostró una fuerte actividad anti-Listeria (Alvarez-Cisneros *et al*., 2010). En estudios realizados por Alvarez-Cisneros *et al*. (2017) la cepa fue sensible a todos los antibióticos probados y no demostró formación de histamina, cadaverina o putrescina. Por lo tanto, podría emplearse como parte de un método de bioconservación, debido a que no produce factores de riesgo para la salud del consumidor; además, podría utilizarse como parte de la tecnología de preservación en alimentos.

L. reuteri DSM17918. La suplementación puede reducir la proporción de niños con episodios de asma (Lin *et al*., 2018).

L. reuteri DSM17938. Supervivencia intestinal. Tolera el jugo simulado del intestino delgado con pancreatina y bilis. Tienen una buena capacidad de adhesión a líneas celulares intestinales. Esta cepa induce una colonización significativa del estómago, duodeno e íleon de seres humanos sanos. La colonización estuvo asociada a una disminución del número de histiocitos de la mucosa gástrica, aumento del número de linfocitos B duodenales y una cantidad significativamente mayor de linfocitos T CD4 en el epitelio ileal (Narvhus *et al*., 2016). *L. reuteri* DSM17938 se usa para tratar la gastroenteritis en niños. El mecanismo potencial proviene de los efectos antiinflamatorios (Xu *et al*., 2015). Un efecto potencialmente beneficioso de la exposición a *L. reuteri* DSM17938 fue la reducción de la prevalencia de *F. nucleatum* ss vincentii y *F. periodicum*, que puede estar

relacionado con la reducción de la formación de biopelículas y el desarrollo de gingivitis durante la ingestión de bacterias probióticas (Romani Vestman *et al*., 2015). La alimentación esta cepa inhibió la percepción de dolor en ratas con distensión gástrica (Perez-Burgos *et al*., 2015).

Tabla 3. Cepas bacterianas utilizadas en los ensayos.

Especie	Cepa	Fabricante/Origen
Probióticos		
Lactobacillus rhamnosus	R0011	Lallemand
Lactobacillus helveticus	R0052	Lallemand
Lactobacillus rhamnosus	Lr-32	DuPont
Lactobacillus paracasei	Lpc-37	DuPont
Lactobacillus casei	Shirota	Yakult
Enterococcus faecium	MXVK29	Universidad Autónoma Metropolitana, México
Lactobacillus reuteri	DSM17918	BioGaia
Lactobacillus reuteri	DSM17938	BioGaia
Iniciadores de salames		
Lactobacillus plantarum	Lp-UCC	Universidad Católica de Córdoba, Argentina
Lactobacillus sakei	Ls-UCC	Universidad Católica de Córdoba, Argentina
Pediococcus pentosaceus	PCFF-1	Chr. Hansen
Staphylococcus xylosus	DD-34	Chr. Hansen
Penicillium nalgiovense	MOLD-600	Chr. Hansen
Pediococcus pentosaceus + *Staphylococcus xylosus*	Bactoferm F1-100	Chr. Hansen
Patógenos asociados a salames		
Listeria monocytogenes		Hospital Pediátrico del Niño Jesús, Argentina
Staphylococcus aureus	ATCC 25923	Hospital Pediátrico del Niño Jesús, Argentina
Escherichia coli	ATCC 25922	DSPV-FCV-UNL, Argentina
Salmonella dublin	DSPV 595T	DSPV-FCV-UNL, Argentina

III.2. Cuantificación de cepas.

Las cepas fueron inoculadas en caldo MRS (Britania®, Buenos Aires, Argentina) e incubadas en baño termostático con agitación continua a 37°C. Se realizaron determinaciones de densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) con un

turbidímetro automático (Bioscreen C, Finlandia) y paralelamente se efectuaron los recuentos en placa para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC). Esto se realizó al comienzo (t=0), a las 2 h (cuando se observó turbidez en el tubo) y a lo largo de 12 h (mediciones aproximadamente cada 30- 40 min) hasta totalizar 20 mediciones. Los ensayos se realizaron por triplicado y en dos oportunidades diferentes. Para cada cepa se construyó su curva estándar de calibración a partir de la DO_{600} obtenida y del logaritmo de las UFC a 37°C. Las curvas se utilizaron para evaluar la capacidad de crecimiento de las cepas y también para cuantificar rápidamente las cepas cuando se usaron en ensayos posteriores.

III.3. Producción de ácido y gas a partir de carbohidratos.

Los cultivos puros se inocularon en caldo MRS adicionado con glucosa al 1%, indicador verde de bromocresol (Sigma-Aldrich®, Buenos Aires, Argentina) 0,05 g/l y campanas de Durham (Rodríguez Haro *et al*., 2012) y se incubaron a 37°C durante 24 h. Tanto el cambio de color de verde a amarillo indicando la producción de ácido y la presencia de gas manifestado por las burbujas dentro de las campanas, fueron considerados como reacciones positivas.

III.4. Producción de ácido láctico.

Para medir la producción de ácido láctico se siguió la metodología descripta por Erkkilä *et al*. (2001b) con algunas modificaciones. Las cepas fueron cultivadas en agar MRS (Britania®) a 37°C por 2 d. Se tomaron 3 colonias de cada cepa en estudio y se inocularon en 10 ml de caldo MRS (Britania®). Luego de 48 h de incubación a 22°C, los caldos fueron purificados con cartuchos de extracción en

fase sólida de intercambio iónico (EFS-SPE). El ácido láctico fue separado en fase reversa con una columna (LiChrosorb® Hibar® RP-18 250-4,6 mm, 5µm) mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC). La concentración de ácido láctico de las muestras fue determinada en una longitud de onda de 210 nm usando el método de patrón externo con los patrones de 50, 100, 150 y 200 mM. La fase móvil (H_2SO_4 50 mM) fue propulsada a un flujo de 1,5 ml/min y a una temperatura de columna de 30°C. El tiempo de retención de ácido láctico fue aproximadamente de 4,8 min. Tanto los patrones como las muestras fueron procesados por triplicado. Se midió el pH de los caldos al inicio y luego del período de incubación. Como control se utilizó el iniciador comercial *P. pentosaceus* PCFF-1.

III.5. Efecto de la temperatura en el crecimiento de bacterias ácido lácticas probióticas.

El crecimiento de BAL a diferentes temperaturas fue observado en caldo MRS luego de incubar a 7 y 15°C durante 14 d y a 22, 30, 37 y 43°C durante 7 d (Cai *et al*., 1998). Los primeros valores corresponden a temperaturas utilizadas en la elaboración de embutidos crudos-curados; mientras que 43°C es la temperatura utilizada en los ensayos de recuperación de microorganismos de embutidos crudos-curados y es de interés para futuros estudios. Los cultivos fueron inoculados al 1%. Se realizaron determinaciones de densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) con un turbidímetro automático (Bioscreen C, Finlandia) y se correlacionaron con las unidades formadoras de colonias (UFC) al inicio (d 0) y luego del período de incubación.

III.6. Efecto del pH, nitrito de sodio y cloruro de sodio en la supervivencia y crecimiento de bacterias ácido lácticas probióticas.

Para estudiar *in vitro* las condiciones de fermentación y maduración que se dan durante la elaboración de un salame y el efecto combinado del pH, el nitrito de sodio y el cloruro de sodio sobre las cepas se siguió la metodología descripta por Korkeala *et al*. (1992) con modificaciones. Los cultivos se hicieron crecer en 2 medios diferentes; medio de fermentación con niveles de pH 4,5; $NaNO_2$ 100 mg/l y NaCl 2% (w/v) y medio de maduración con niveles de pH 5,5; $NaNO_2$ 200 mg/l y NaCl 3% (w/v). Ambos medios fueron preparados en caldo MRS. Como control se utilizó caldo MRS ajustado a pH 6,5 sin el agregado de $NaNO_2$ y NaCl. Los pocillos de las microplacas fueron sembrados con 240 µl de medio e inoculados con 2,4 µl de cultivo de 18 h. Las determinaciones se realizaron por triplicado. El crecimiento fue monitoreado utilizando un lector Multi-Modal de microplacas Synergy™ HT (BioTek®, U.S.A.). Las microplacas se incubaron a 37°C durante 24 h y se midió la absorbancia de los cultivos cada 30 min a una longitud de onda de 620 nm (DO 620 nm). El delta de la absorbancia (diferencia entre la primera y la última lectura de la absorbancia), el gradiente (pendiente de la fase de crecimiento logarítmico) y la fase de latencia (tiempo transcurrido desde la siembra hasta que se inicia el crecimiento bacteriano) fueron recolectados, analizados y exportados con el Software para Análisis de Datos Gen5 y finalmente utilizados para caracterizar el crecimiento. La ausencia de crecimiento fue evaluada considerando a la fase de latencia igual a 24 h.

III.7. Caracterización enzimática.

Las cepas fueron caracterizadas teniendo en cuenta las siguientes pruebas:

III.7.1. Producción de peróxido de hidrógeno.

La capacidad de las cepas para producir H_2O_2 se determinó siguiendo la metodología descrita por McLean y Rosenstein (2000). Los cultivos bacterianos se sembraron en 15 ml de agar MRS (Britania®) suplementado con 2,5 mg/ml de tetrametilbencidina (TMB) (Sigma-Aldrich®) y 0,01 mg/ml de peroxidasa de rábano (HRP) (Sigma-Aldrich®). Las placas se incubaron a 37°C durante 48 h en condiciones de anaerobiosis. Después del período de incubación, las placas se abrieron y se expusieron al aire atmosférico durante 30 min. Después de la exposición, las colonias de las cepas que producen H_2O_2 viraron al color azul. En presencia de H_2O_2 la enzima HRP oxida el TMB (incoloro) para dar lugar a la formación de un pigmento azul. Al interpretar los resultados se consideró que la tonalidad del color azul era una medida semicuantitativa de la cantidad de H_2O_2 producido y liberado al medio por la cepa (Rosenstein *et al*., 1997). A partir de esto, se diferenció la tonalidad del color azul en las siguientes categorías: azul claro (menor producción) o azul oscuro (mayor producción). En el ensayo, las cepas *L. plantarum* Lp-UCC y *L. sakei* Ls-UCC se utilizaron como controles positivos (Talon *et al*., 2000) y el iniciador comercial *P. pentosaceus* PCFF-1 para evaluar su comportamiento.

III.7.2. Actividad catalasa e hidrólisis del peróxido de hidrógeno.

Para demostrar la presencia de la enzima catalasa (una enzima capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno), se siguieron las técnicas descritas por Harrigan (1998) y se realizaron ensayos en placas y en tubos. Los cultivos puros se cultivaron en agar MRS (Britania®), caldo MRS (Britania®) y caldo Nutritivo (Britania®) a 37°C durante 24 a 48 h. Después del período de incubación, se colocaron unas gotas de H_2O_2 al 3% sobre las colonias cultivadas en placas y se agregó 1 ml de la misma solución a los cultivos desarrollados en tubos. Se consideraron pruebas positivas la aparición de burbujas en las placas y en los caldos provocadas por la liberación de oxígeno. Las pruebas se llevaron a cabo por triplicado y se usó *S. aureus* ATCC 25923 como una cepa de control de catalasa positiva.

III.7.3. Reducción de nitratos y nitritos.

La técnica descripta en MacFaddin (2003) se utilizó para determinar la capacidad de los microorganismos para reducir los nitratos a nitritos o gas nitrógeno libre. Se elaboró caldo nutritivo (Britania®) con nitrato de potasio (Sigma-Aldrich®) 1 g/l. Se utilizaron dos reactivos para revelar la presencia de nitritos en el medio: reactivo A (ácido sulfanílico (Sigma-Aldrich®) al 0,8% en ácido acético 5N) y reactivo B (α-naftilamina (Sigma-Aldrich®) al 0,5% en ácido acético (Sigma-Aldrich®) 5N). Los caldos con nitrato se inocularon con cultivos puros y se incubaron durante 48 h a 37°C. Los ensayos se realizaron por triplicado y *S. aureus* ATCC 25923 y *S. xylosus* DD34 se usaron como cepas de control positivas. Después del período de incubación se añadieron 0,5 ml de reactivo A y luego 0,5 ml de reactivo B. La aparición de color rojo en el medio (después de aproximadamente 30 segundos) indicó la presencia de nitritos en el medio.

La reducción de nitratos puede dar otros productos más reducidos como amoníaco, nitrógeno molecular, óxido nítrico, óxido nitroso o hidroxilamina, en este caso, tras la adición de los reactivos, no se produce cambio de color en el medio. Para confirmar que el proceso era negativo, se añadió polvo de zinc (Sigma-Aldrich®) que, si existían nitratos, los reducía a nitritos, tiñendo el medio de rojo, y en consecuencia indicando que previamente no se había producido la reacción. Si después de la adición de polvo de zinc el color no se vuelve rojo, esto indica que hubo una reducción y que el producto obtenido no fue nitrito sino un producto más reducido.

III.7.4. Hidrólisis de la caseína de la leche.

Para examinar la actividad proteasa, se siguió la metodología descrita por Harrigan (1998) con algunas modificaciones. Se prepararon dos medios de cultivo. 1) Agar leche desnatada: 5% leche desnatada en polvo y 1,3% agar (Britania®). 2) Agar leche descremada con peptona: Se prepararon por separado leche descremada en polvo al 2% en agua destilada y agar agar (Britania®) a una concentración de 1.3% en agua peptonada (Britania®); se esterilizaron, se dejaron enfriar a 45°C y luego se homogeneizaron y distribuyeron en placas de Petri. Se prepararon placas con perforaciones de 6 mm de diámetro que se llenaron con 20 µl de cultivos frescos y placas sin perforaciones que se sembraron por estría con los mismos cultivos frescos. *S. aureus* ATCC 25923 se utilizó como control positivo. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 a 72 h. La presencia de un halo transparente alrededor de las colonias crecidas y los pocillos se consideró como una reacción positiva de proteólisis de la caseína. El ensayo se realizó por triplicado y en dos ocasiones diferentes.

III.7.5. Actividad lecitinasa y lipasa.

Para examinar la actividad de los microorganismos para producir las enzimas lecitinasa y lipasa, se siguió la metodología descrita en MacFaddin (2003). Se prepararon dos medios de cultivo: agar Tripteína de Soya (Britania®) y agar Cerebro Corazón Infusión (Britania®) enriquecidos con yema de huevo estéril al 10%. Se prepararon placas con perforaciones de 6 mm de diámetro que se llenaron con 20 µl de cultivos frescos y placas sin perforaciones que se sembraron por estrías con los mismos cultivos frescos. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se utilizó como control positivo. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 a 72 h. La hidrólisis de la lecitina libera fósforo y colina en etapas y la precipitación de grasas insolubles (diglicéridos) produce la opalescencia del medio. Un halo opaco rodeando las colonias se consideró como prueba lecitinasa positiva, por otro lado, la enzima lipasa, cataliza la hidrólisis de triglicéridos y diglicéridos a ácidos grasos y glicerol, esto, que se evidencia por un brillo aceitoso, iridiscente, sobre las colonias y alrededor de ellas, se consideró como actividad lipasa positiva.

III.8. Antagonismo contra *Staphylococcus xylosus*.

Para evaluar el antagonismo de las BAL probióticas frente a *Staphylococcus xylosus*, cepa que formará parte del cultivo iniciador diseñado, se utilizó el método de la mota en el césped (Lewus *et al*., 1991) y la técnica de difusión en agar (Tagg and McGiven, 1971).

Para el método de la mota en el césped se prepararon placas de agar MRS (Britania®) las cuales fueron sembradas con 2,6 µl de cultivo fresco de las cepas BAL en estudio y se incubó a 37°C durante 24 h. Las placas se cubrieron con 15 ml de agar Cerebro Corazón Infusión (BHI) al 1,5% (Britania®) inoculados con 1,5 µl de cultivo fresco de *S. xylosus* y se incubaron a 37°C durante 24 h. Los resultados

se informaron como positivos o negativos considerando la presencia o ausencia de zonas claras de inhibición respectivamente.

En la técnica de difusión en agar se evaluó la producción de sustancias inhibidoras en extractos libres de células (ELC) de las cepas BAL. Las BAL se cultivaron en caldo MRS durante 24 horas a 37°C. A continuación, se centrifugaron a 5000 X*g* en una centrífuga refrigerada a 4°C (IEC Multi RF Thermo, España) durante 10 min. Posteriormente, una alícuota del sobrenadante se ajustó a pH 6,5 usando NaOH como neutralizador para evitar la inhibición ácida (ELC neutralizado). Otra alícuota se usó directamente como ELC sin neutralizar. Ambos sobrenadantes se esterilizaron por filtración, con un diámetro de poro de 0,22 µm (Millipore, Merck, Alemania). Placas de Petri con 15 ml de agar sólido BHI (agar 1,5%) se cubrieron con 9 ml de agar semisólido BHI (agar 0,8%) inoculado con 1,5 µl de cultivo fresco de *S. xylosus*. En la capa de agar superior se perforaron varios orificios (6 mm) y se llenaron con 20 µl de ELC neutralizado y no neutralizado de las cepas BAL. Las placas inoculadas se incubaron a 4°C durante 1 hora para permitir la difusión de los extractos y luego se incubaron a 37°C durante 24 horas y se examinaron en busca de halos claros de inhibición alrededor de los pocillos. Los resultados fueron reportados como positivos o negativos considerando la presencia o ausencia de zonas de inhibición respectivamente.

III.9. Descarboxilación de aminoácidos.

Para evaluar la actividad amino descarboxilasa (Schillinger and Lücke, 1987) se utilizó un método cualitativo. Se preparó un medio de cultivo con la siguiente composición: peptona de caseína (Sigma-Aldrich®) 0,5%, extracto de levadura (Oxoid®, Reino Unido) 0,3%, glucosa D (+) (Biopack®) 0,1% y púrpura de bromocresol (Sigma-Aldrich®) 0,0016%. Al 0,9% del medio base se le agregó 0,5% del aminoácido a ensayar, en este caso L-Arginina (Anedra®, Buenos Aires, Argentina), L-Histidina (Anedra®), L-Lisina (Anedra®), L-Tirosina (Anedra®) y L-Triptófano (Anedra®). Luego se ajustó el pH del medio a 6,7 ± 0,1 a 25°C. Los

tubos se inocularon con 10 µl de cultivo de 24 h y se incubaron 72 h a 37°C en condiciones aeróbicas. El color del medio en el momento de la inoculación era púrpura. Además de las cepas probióticas, en el ensayo se utilizaron las cepas de *P. pentosaceus* PCFF-1, *L. plantarum* Lp-UCC y *L. sakei* Ls-UCC para observar cómo se comportaban con respecto a los aminoácidos probados. En los casos en que la cepa no descarboxiló el aminoácido, el color del medio permaneció amarillo hasta el final de la prueba y la prueba se consideró negativa. Por el contrario, cuando la cepa descarboxiló el aminoácido, el color se volvió púrpura y la prueba se consideró positiva.

Fundamento: Las bacterias utilizan los carbohidratos como fuente de carbono y acidifican el medio, virando el color púrpura al amarillo. Al poco tiempo deben comenzar a utilizar otra fuente de carbono, pues la concentración en el medio es baja. Cuando comienzan a descarboxilar los aminoácidos el pH del medio aumenta y el medio vira al color púrpura original. En el caso que la cepa no descarboxile el aminoácido en prueba, el color del medio se mantiene amarillo hasta el final del test.

III.10. Antagonismo contra patógenos asociados a salames.

El antagonismo de las cepas probióticas frente a los patógenos *E. coli*, *L. monocytogenes,* Salmonella dublin y *Staphylococcus aureus* fue estudiado según el método de la mota en el césped descripto por Lewus *et al*. (1991), la técnica de difusión en agar descripta por Tagg and McGiven (1971), en la cual una alícuota del sobrenadante se ajustó a pH 6,5 usando NaOH como neutralizador para evitar la inhibición ácida (ELC neutralizado) y otra alícuota se usó directamente como ELC sin neutralizar, indicadas anteriormente y la actividad antimicrobiana en microplaca descripta por Ruíz-Moyano *et al*. (2009) con algunas modificaciones.

En la actividad antimicrobiana en microplacas se estudió la capacidad de los microorganismos patógenos de crecer en medios de cultivo que contenían ELC neutralizados provenientes de bacterias probióticas. El crecimiento de los

patógenos fue monitoreado utilizando un lector Multi-Modal de microplacas Synergy™ HT (BioTek®, U.S.A). Cada pocillo de las microplacas fue sembrado con 120 µl de caldo BHI doble concentración suplementado con 120 µl de ELC neutralizado de la cepa probiótica en estudio. Los pocillos fueron inoculados con 2,4 µl de cultivo de 18 h del patógeno blanco. Se utilizó caldo BHI simple concentración, pH 6,5 sin suplementar, inoculado con cada una de las cepas patógenas, como control positivo. La siembra fue realizada por triplicado. Las microplacas se incubaron a 37°C durante 24 h y se midió la absorbancia de los cultivos cada 30 min a una longitud de onda de 620 nm (DO 620 nm). El delta de la absorbancia (diferencia entre la primera y la última lectura de la absorbancia), el gradiente (pendiente de la fase de crecimiento logarítmico) y la fase de latencia (tiempo transcurrido desde la siembra hasta que se inicia el crecimiento bacteriano) fueron recolectados, analizados y exportados con el Software para Análisis de Datos Gen5 y se utilizaron para caracterizar el crecimiento. La ausencia de crecimiento fue evaluada considerando a la fase de latencia igual a 24 h. El efecto inhibitorio de los sobrenadantes de los cultivos probióticos fue determinado comparando el máximo crecimiento (Nmax) con respecto al control positivo.

III.11. Enumeración selectiva de *L. rhamnosus* Lr-32.

En el diseño de un medio de cultivo para el aislamiento selectivo de *Lactobacillus rhamnosus* Lr-32 se siguió la metodología descripta por Tharmaraj and Shah (2003) con modificaciones. Se preparó una solución stock de 100 mg/ml de clorhidrato de vancomicina (farmacia local, >95% pureza) con agua destilada estéril (farmacia local). La solución puede mantenerse a 0- 4°C y permanece estable durante al menos tres meses (Hartemink *et al*., 1997). Para preparar el medio de cultivo agar De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) con vancomicina (MRS-V), se utilizó agar MRS estéril y se le añadió asépticamente la solución stock de vancomicina para obtener una concentración final de 1 mg/l de clorhidrato de vancomicina. En este ensayo se utilizaron las cepas *L. rhamnosus* Lr-32 (probiótico

en estudio), *P. pentosaceus* PCFF-1 (iniciador comercial utilizado como control), *L. plantarum* Lp-UCC y *L. sakei* Ls-UCC (BAL aisladas con mayor frecuencia de salames procesados con diferentes tecnologías) (Palavecino Prpich *et al*., 2021) y *E. faecium* MXVK29 (para corroborar el efecto inhibitorio de la vancomicina) (Hartemink *et al*., 1997) Los cultivos bacterianos se hicieron crecer en caldo MRS (Britania, Argentina) a 37°C por 18 h utilizando 1% de inóculo.

Aislamiento de bacterias: Se preparó agua de peptona 0,1% (Britania, Argentina) (para realizar los homogenatos y las diluciones), placas de agar MRS y agar MRS-V (para realizar las siembras). Las placas se sembraron por triplicado con diluciones decimales de muestra A: homogenato preparado con 10 gr de salame comercial; muestra B: homogenato preparado con 10 gr de salame comercial inoculado con *L. rhamnosus* Lr-32 (1%), y muestra C: inóculos puros (1%) de las cepas *L. rhamnosus* Lr-32, *E. faecium* MXVK29, *P. pentosaceus* PCFF-1, *L. plantarum* Lp-UCC, y *L. sakei* Ls-UCC. Las placas fueron incubadas a 30 y 43°C por 72 h en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis (jarras herméticas con sobres para generar anaerobiosis, AnaeroPack®, Quántica®, Argentina). Luego del período de incubación se observó el crecimiento en los diferentes medios de cultivo, y se realizó el recuento de UFC. Los crecimientos en placas de MRS-V a 43°C se identificaron por observación de la morfología de las colonias crecidas, tinción de Gram, catalasa y microscopia. Se realizaron aislamientos de colonias a partir de placas de MRS-V a 43 °C y se obtuvieron cultivos puros que se conservaron congelados a -70°C para su posterior identificación.

III.12. Elaboración de los salames.

Los salames fueron preparados siguiendo la metodología descripta por Erkkilä *et al*. (2001a) con algunas modificaciones. Se realizó la formulación de un salame tipo colonia, Argentina. La materia cruda estuvo compuesta por: 70% de carne porcina, 10% de carne vacuna y 20% de grasa de cerdo (tocino). A esta pasta se le adicionaron 2,5% de cloruro de sodio, especias (pimienta blanca, nuez

moscada, canela, ajo y clavo de olor), azúcar y vino blanco. Como aditivos se empleó como antioxidante Belcolor®: ácido ascórbico (INS 300) y eritorbato de sodio (INS 316); emulsionante Belmin®: pirofosfato y tripolifosfato de sodio (INS 451); y como conservante sal de cura: nitrato de sodio (INS 251).

Se elaboraron 50 kg de pasta que fueron divididos en 3 lotes de 16,6 Kg y cada lote estuvo constituido por 60 unidades de salame de 0,280 Kg aproximadamente (Fig. 1). El lote I se preparó sin la adición de un iniciador para monitorear la fermentación por microbiota natural. El lote II fue inoculado con Bactoferm F1-100 (cultivo iniciador mixto para carnes de *P. pentosaceus* y *S. xylosus*) (Chr. Hansen®, Hørsholm, Dinamarca) según indicaciones del fabricante (25 g/100 kg de pasta). El lote III fue inoculado con la cepa experimental *L. rhamnosus* Lr-32 (DuPont, Madison, WI, U.S.A) como cultivo puro crecido en caldo MRS a 30°C por 48 h, para alcanzar 7 $\log_{10}$ UFC/g de materia cruda (se agregó 100 ml de caldo/10 Kg de pasta) (Erkkilä *et al*., 2001a). Normalmente staphilococci es utilizado en combinación con una BAL para asegurar la formación de color (Erkkilä *et al*., 2001a; Erkkilä *et al*., 2001b). En este estudio, el cultivo comercial *S. xylosus* DD-34 (Chr. Hansen®, Hørsholm, Dinamarca) fue añadido a la pasta para alcanzar 6 $\log_{10}$ UFC/g de materia cruda (1g/10 Kg de pasta) (Erkkilä *et al*., 2001a; Lücke, 2000). Los lotes I y II fueron utilizados como control. Las pastas fueron embutidas dentro de una envoltura de tripa natural vacuna de 40-45 mm de diámetro. Se produjeron micro perforaciones a fin de eliminar los restos de aire. Los embutidos fueron sumergidos en agua con iniciador fúngico comercial, *Penicillium nalgiovense* MOLD-600 (Chr. Hansen®, Hørsholm, Dinamarca), según indicaciones del fabricante (5 g por cada 5 litros de agua), con la finalidad de obtener una mufa homogénea de coloración blanquecina.

Todos los lotes fueron sometidos al mismo tratamiento: se realizó el escurrido vertical de las ristras ya embutidas durante 6 h a una temperatura de 10 a 15°C, 2 d de fermentación a 20- 22°C y 85% de HR, seguido por una reducción gradual de la temperatura de (20 a 18°C) y HR (de 85 a 70%) por los siguientes 2 d y luego 9 d de secado a 14- 16°C y 70% de HR. Esto se realizó en una cámara con sistema de control automático y circulación de aire controlado a fin de producir pérdida paulatina y controlada de agua del producto. Al día 14 los salames fueron retirados del secadero, se les quito la envoltura, se envasaron al vacío y se conservaron a 4°C durante 82 días.

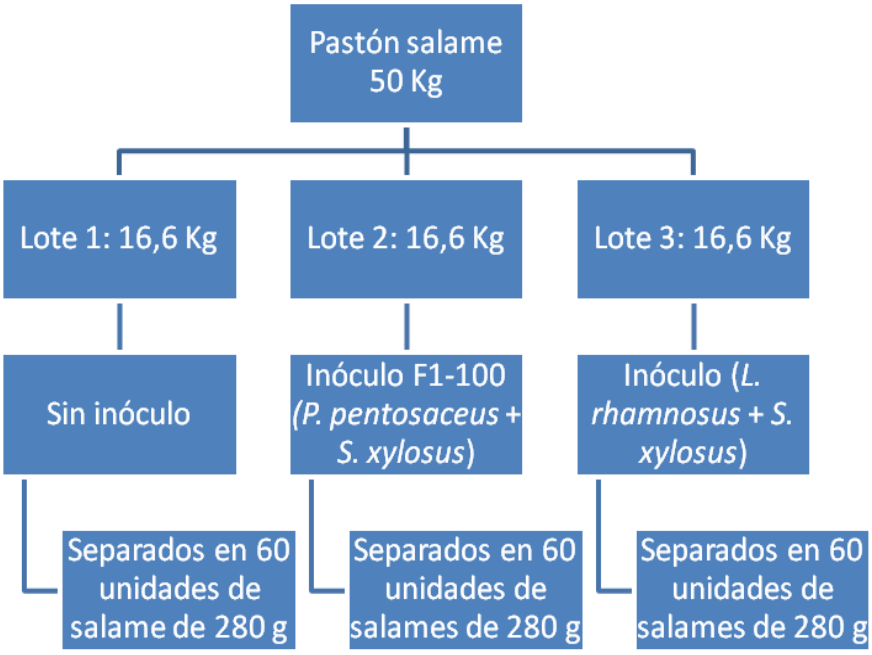


Figura 1. Modelo de elaboración de salames.

III.13. Determinaciones fisicoquímicas.

III.13.1. Medición de pH.

Se utilizó la técnica descripta por Cañeque y Sañudo (2000). Para obtener la curva de descenso de pH se utilizó un pHmetro con electrodo de penetración y termómetro (Testo® 205 pH, Argentina), introduciéndolo directamente en tres puntos del embutido, extremo superior, centro y extremo inferior. Previamente se calibró automáticamente el equipo con soluciones buffer (Cicarelli® Argentina) a pH 4 y pH 7. Las mediciones se realizaron al día 0 (día de elaboración) y luego a los 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11 y 13 días de fermentación y maduración.

III.13.2. Pérdida de peso.

Para el cálculo de la perdida por oreo, expresada como porcentaje de merma (Me %), se pesaron los salames, empleando una balanza granataria (Kretz Cenit®, Argentina). Las pérdidas de peso se expresan como porcentaje del peso inicial, siguiendo la técnica recomendada por Muguerza *et al*. (2003). Se pesaron tres salames y se utilizó la media. Las mediciones se realizaron al día 0 (día de elaboración) considerado dicho peso como el peso inicial. Las mismas ristras se volvieron a pesar a los 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11 y 13 días de fermentación y maduración.

III.13.3. Medición objetiva del color.

Se realizaron según las normas de la A*merican Meat Science Association*, con un espectrofotómetro (Minolta® CM-600d, Japón), usando el Iluminante D65 y ángulo de 10° (Norma UNE 40-080, 1984) y espacio de color CIELAB. Para la medición se interpusieron cristales de baja reflectancia CR-A5/1829-752 (Minolta®, Japón), entre las muestras y el equipo. Los parámetros de color estudiados fueron los siguientes: L*(luminosidad), Coordenada a* (rojo-verde) o *redness*, Coordenada b* (amarillo-azul) o *yellowness*. Se realizó la medición del color en el pastón (Color D0), durante la etapa de fermentación (Color D2), secado/maduración (Color D7) y vida útil del producto envasado al vacío (Color D14, D21, D28, D35, D49, D63, D77, D95).

III.14. Determinaciones microbiológicas.

Se tomaron asépticamente 3 muestras de 10 gr de cada pastón (3 pastones) y 10 gr del núcleo de 3 salames de cada lote (3 lotes). Se colocaron en bolsas plásticas estériles (BagLight®, Interscience, Francia) con 90 ml de agua de peptona (0,1%) (Britania®, Argentina). Se homogeneizaron durante 60 seg utilizando un Stomacher (BagMixer®400, Interscience, Francia). Luego se realizaron diluciones decimales de los homogeneizados en agua de peptona estéril (0,1%) y se sembraron por duplicado. El recuento de colonias se determinó cultivando las diluciones en los medios correspondientes. El número de *Staphylococcus* fue determinado en medio Manitol Salado Agar (MSA) (2 d a 37°C), BAL en Agar De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (3 d a 30°C) y en MRS con vancomicina (MRS-V) con incubación anaeróbica (3 d a 43°C) (Tharmaraj and Shah, 2003). Así también se realizó el recuento de enterobacterias en medio Violeta cristal- Rojo neutro-Bilis- Glucosa- Agar (VRBGA) (1 d a 37°C). Los medios de cultivo utilizados fueron marca Britania®, Argentina. Cada lote fue analizado microbiológicamente el día de la elaboración (D_0) y luego a los 2, 7, 14, 21, 28, 35, 49, 63, 77 y 95 días. A partir de las placas de MRS-V se recolectaron colonias, las cuales se hicieron crecer como cultivos puros en caldo MRS. Los cultivos puros se almacenaron a -70C° (frízer Righi®, Argentina) en caldo MRS suplementado con 20% (v/v) de glicerol para su posterior análisis molecular.

III.15. Análisis de aceptabilidad.

Se utilizó una técnica afectiva de aceptabilidad con el objetivo de evaluar el grado de satisfacción de los productos elaborados. Las mediciones se realizaron sobre el producto terminado con 15 días de elaboración, sobre fetas de cada salame de 5 mm de espesor, a las que se les eliminó la tripa, para luego ser

colocadas de a dos fetas, envueltas en film de aluminio, sobre bandejas plásticas de poliestireno.

Los panelistas (n= 20) fueron entrenados previamente. En el ensayo, se les dio para testear 3 salames diferentes: control I= sin inoculo, control II= con inoculo Bactoferm F1-100, y salame experimental III= con inoculo *L. rhamnosus* Lr-32 + *S. xylosus*. Cada una de las palabras descriptivas, después de la sensación al consumirlos, se evaluó de 1 a 5 como: muy agradable (5), agradable (4), ni agradable/ni desagradable (3), desagradable (2) y muy desagradable (1). Los panelistas realizaron de forma independiente la evaluación de los salames experimentales.

III.15.1. Preparación de la muestra de ensayo.

Los embutidos envasados al vacío/refrigerados, fueron retirados de su envase 30 minutos antes de la realización de la prueba y colocados inmediatamente en papel *foil* de aluminio, con el fin de no transmitir olores o sabores externos. Las fetas de salame se mantuvieron a temperaturas de refrigeración: en un rango de 5 a 7°C al momento del análisis, sin ningún tipo de vehículo.

III.15.2. Características del panel.

El panel estuvo compuesto por 20 jueces entrenados de ambos sexos, con edades entre 18 a 60 años, que consumen frecuentemente embutidos crudo-curados: salame.

Estuvo integrado por alumnos, docentes y administrativos de la unidad académica en donde se ejecutó el proyecto.

El panel fue entrenado en sesiones teórico y prácticas de aproximadamente 30 minutos cada una.

El adiestramiento teórico se realizó mediante una charla expositiva dialogada sobre el proceso de producción, característica de producto y especificaciones de calidad en el salame. En el adiestramiento práctico se realizaron pruebas discriminativas tipo dúo-trío simples y complejas con la finalidad de calibrar el panel.

De la misma manera se los entrenó con productos comerciales y la formulación control.

Los entrenamientos y pruebas individuales fueron ejecutados en cubículos semi-aislados.

Tanto en los entrenamientos como en la evaluación de aceptabilidad propiamente dicha, las muestras se ordenaron aleatoriamente; cada muestra fue codificada con tres dígitos aleatorios, que variaron en cada repetición de la prueba.

Como alimento de limpieza se utilizó agua y galletas tipo *cracker* sodada de bajo tenor graso y sodio (Mayco®, Terrabusi, Nabisco), entre cada muestra.

Una vez analizada la primera muestra, se retiró la misma, y posteriormente se le asignó la segunda, y se procedió de la misma manera con la tercera.

La sala de cata se mantuvo a una temperatura entre 18 y 22ºC, contó con iluminación natural y artificial mediante una fuente lumínica (350 lux), libre de olores y corrientes de aire.

Una vez calibrado el panel, se iniciaron las pruebas con las tres formulaciones. Se realizaron tres repeticiones con dichos productos, con un mínimo de 48 h entre cada evaluación, para evitar el acostumbramiento.

Se utilizó una escala verbal estructurada de cinco puntos para la aceptabilidad general (Tabla N°4).

Tabla 4. Valoración de Aceptabilidad.

Aceptabilidad general	Valoración
Muy agradable	5
Agradable	4
Ni agradable/Ni desagradable	3
Desagradable	2
Muy desagradable	1

Una vez completo el análisis los panelistas llenaron la planilla correspondiente (ver Anexo VII.4).

III.16. Aislamiento e identificación de *Lactobacillus rhamnosus* Lr-32.

A partir de las colonias crecidas y seleccionadas en el medio de cultivo diferencial MRS-V, que fueron conservadas como cultivos puros a -70°C, se realizaron las siguientes pruebas de biología molecular para su identificación.

III.16.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

III.16.1.1. Extracción del ADN bacteriano, amplificación del ADNr 16S y secuenciación del fragmento amplificado.

Se extrajo el ADN genómico de 4 muestras aisladas (D2, D35, D63, D95) de los salames elaborados, obtenidos a partir del medio de cultivo diferencial MRS-V, mediante la técnica de CTAB (Murray and Thompson, 1980) y se amplificó el gen ADNr 16S de acuerdo a Kim y Chun (2005) utilizando los cebadores Lr32_CRO_RTf (CGA CCA AGT TCA AAT CTT TCA GC) y Lr32_CRO_RTr (GGG CAA ATA TTA GAG ACA AAA TAC ACG). Los cebadores fueron obtenidos y el ensayo realizado siguiendo la recomendación del fabricante. La reacción fue conformada utilizando 20- 50 ng de ADN en 25 µL conteniendo 1,5 mM $MgCl_2$, 200 µM de cada deoxinucleotido (Promega®), 0,4 µM de cada cebador (Lr32_CRO_RTf y Lr32_CRO_RTr) y 1U de Taq polimerasa (GoTaq, Promega®) en 1X de buffer de la Taq (Promega®). Las muestras fueron colocadas en un termociclador (MJ Research®) y las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94°C 2 min; 25 ciclos de 94°C 2 min, 94°C 30 seg, 54,5°C 30 seg, 72°C 30 seg, 72°C 3 min y un paso de extensión final de 15°C 24 min.

Los fragmentos obtenidos fueron separados en geles de agarosa al 1% p/v por electroforesis en buffer TBE 1X. La tinción del gel se realizó con Gel Red Nucleic Acid Stain (BIOTIUM®). Cada pocillo del gel de agarosa fue sembrado con 5 µl de cada producto de PCR y posteriormente se realizó una corrida electroforética a 80 V constante durante 30 min. Se utilizó un control negativo de la reacción de amplificación a cuya mezcla no se le agregó ADN molde y contenía la cepa *L. sakei*. El peso molecular estimado de los amplicones del gen 16S ADNr fue de 138 pb. Las bandas reveladas fueron comparadas con un marcador de peso molecular comercial (100 pb DNA Ladder, Promega®).

III.16.2. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE).

PFGE comparó la cepa *L. rhamnosus* Lr-32 pura con aislamientos de los salames elaborados, obtenidos a partir del medio de cultivo diferencial MRS-V, para asegurar que el mismo genotipo se identificara persistentemente. En el ensayo se utilizaron la cepa *L. rhamnosus* Lr-32, 9 aislamientos de diferentes etapas de elaboración y conservación de los salames (D2, D14, D21, D28, D35, D49, D63, D77, D95) y *L. rhamnosus* spp. como control negativo. El protocolo descripto por Doulgeraki *et al*. (2010) fue utilizado con modificaciones. Un cultivo overnight de cada cepa fue repicado en un volumen de 4 ml de caldo MRS (Britania®) y posteriormente incubado a 37°C durante 18 h en anaerobiosis. Los mismos fueron centrifugados durante 5 min a 12000 rpm. El sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido en 1,8 ml de ClNa 0,85 %. La densidad óptica (DO) se midió a 600 nm, ajustando la concentración de las suspensiones celulares a DO 2,0. Los plugs fueron hechos siguiendo la metodología descripta por Blajman *et al*. (2015) La agarosa de bajo punto de fusión 2% (Pulsed Field Certified Agarose, Bio-Rad®) fue calentada en el microondas a potencia baja y mantenida en baño termostatizado a 55°C. Posteriormente, tubos de centrífuga de 1,5 ml y los pocillos de los moldes para plugs se rotularon con los nombres de los cultivos. 150 µl de las suspensiones celulares ajustadas fueron transferidas a los tubos para microcentrífuga de 1,5 ml rotulados. 150 µl de agarosa fundida fueron adicionados a los 150 µl de suspensión celular. Inmediatamente, la mezcla fue dispensada en los pocillos del molde para plugs, evitando la formación de burbujas. Se prepararon dos plugs por muestra, los cuales se dejaron solidificar en la heladera (4°C) por 5 min. Los moldes se abrieron y los plugs fueron transferidos con una espátula a tubos falcon conteniendo tampón NET con lisozima (10 mg/ml) (Sigma®). Los tubos fueron colocados en una gradilla e incubados en un baño termostatizado a 37°C por 24 h. Cada trozo de agarosa se transfirió a un tubo falcon con tampón de lisis (Tris 50 mM, ácido etildiaminotetraacético (EDTA) 50 mM pH 8), lauril sarcosina sódica 1% (Sigma®) 7.6 y proteinasa K 0,5 mg/ml (Promega®- Madison, USA) y se incubó a 37°C durante 24 h. Luego, los tubos fueron retirados del baño termostatizado y el tampón de lisis descartado cuidadosamente. Para los lavados,

se añadió 10 ml de tampón Tris-EDTA (TE) estéril (Tris 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0), dejándose en baño termostatizado a 55°C por 40 min (este paso de lavado se repitió cuatro veces) (Doulgeraki *et al*., 2010). Finalmente, los trozos de agarosa se trasladaron a microtubos con 2 ml de tampón TE 1X estéril, y se mantuvieron a 4°C hasta su utilización posterior.

III.16.2.1. Digestión de ADN genómico.

Para la digestión enzimática se realizó una dilución del tampón 10X con agua de calidad molecular y la enzima de restricción *Sfi* I (Thermo Scientific®). El trozo de agarosa fue digerido con 15 unidades de enzima por trozo de agarosa y un tiempo de incubación de 5 h a 25°C (Yin *et al*., 2007).

III.16.2.2. Electroforesis en campo pulsado.

Los fragmentos de ADN digeridos dentro del trozo de agarosa fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa para PFGE al 2% en tampón TBE 0,5X (Tris-Borato-EDTA). Una vez solidificado el gel, se incorporó cada medio trozo de agarosa en un pozo y se adicionó una capa de agarosa al 2% como sellador. La electroforesis se llevó a cabo en un equipo de electroforesis en campo pulsado CHEF-DR III (Bio-Rad®) con tampón TBE 0,5X. Las condiciones electroforéticas fueron las siguientes: 6 volts/cm (cambio de orientación inicial 5 s, cambio de orientación final 35 s) durante 18 h a 14°C. Después de la electroforesis, los geles fueron teñidos 30 min en bromuro de etidio (10 mg/ml). La imagen fue capturada en el Gel Doc 2000 (Bio-Rad®).

III.17. Tolerancia a la acidez y a las sales biliares.

El estudio se realizó con la cepa pura de *L. rhamnosus* Lr-32 y con aislamientos obtenidos en el medio de cultivo MRS-V, a partir de los salames elaborados, en diferentes etapas: inicio del ensayo (día 0 y 2), mitad del ensayo (día 28 y 50) y finalización del ensayo (día 95).

Para estudiar *in vitro* la tolerancia a bajos niveles de pH y presencia de sales biliares se siguió la metodología descripta por Ruíz Moyano *et. al*. (2008) con modificaciones. La cepa pura de *L. rhamnosus* Lr-32 y los aislamientos fueron expuestos a niveles de pH: 6,5 (control), 4, 3 y 2 ajustado con HCl 1N y concentraciones de bilis bovina (Britania®, Argentina) 0% (control), 0,15%, 0,3% y 0,6%. Se usaron estos valores siguiendo la ficha técnica de la cepa *L. rhamnosus* Lr-32 provista por el proveedor. Los diferentes medios fueron preparados en caldo MRS (Britania®) base. Los pocillos de las microplacas fueron sembrados con 240 µl de medio e inoculados con 2,4 µl de cultivo de 18 h. La densidad óptica se midió a 620 nm (DO_{620}), ajustando la concentración de los cultivos microbianos a DO_{620} 0,020. Las determinaciones se realizaron por triplicado. El crecimiento fue monitoreado utilizando un lector Multi-Modal de microplacas Synergy™ HT (BioTek®). Las microplacas se incubaron a 37°C durante 24 h y se midió la absorbancia de los cultivos cada 30 min (DO_{620}). El delta de la absorbancia (diferencia entre la primera y la última lectura de la absorbancia), el gradiente (pendiente de la fase de crecimiento logarítmico) y la fase de latencia (tiempo transcurrido desde la siembra hasta que se inicia el crecimiento bacteriano) fueron recolectados, analizados y exportados con el Software para Análisis de Datos Gen5 y finalmente utilizados para caracterizar el crecimiento. La ausencia de crecimiento fue evaluada considerando a la fase de latencia igual a 24 h.

III.18. Análisis estadístico.

Para cuantificar las cepas se utilizó un modelo de regresión logarítmica. Los datos representados por variables continuas fueron analizados utilizando un ANOVA. Todos los experimentos del presente estudio se realizaron por triplicado y los valores presentados en los resultados son valores medios de cada triplicado. Los datos experimentales obtenidos se evaluaron estadísticamente a un nivel de significación de $P \leq 0,05$. Se utilizó el programa IBM SPSS Statistics 19. Cuando las diferencias fueron significativas ($P \leq 0,05$), se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de medias de Duncan.

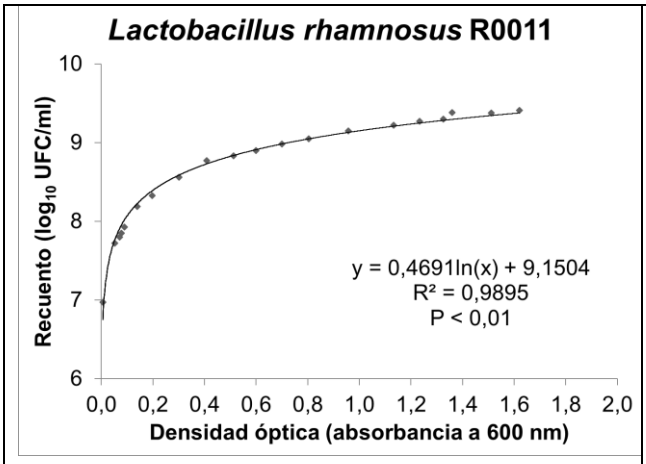
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

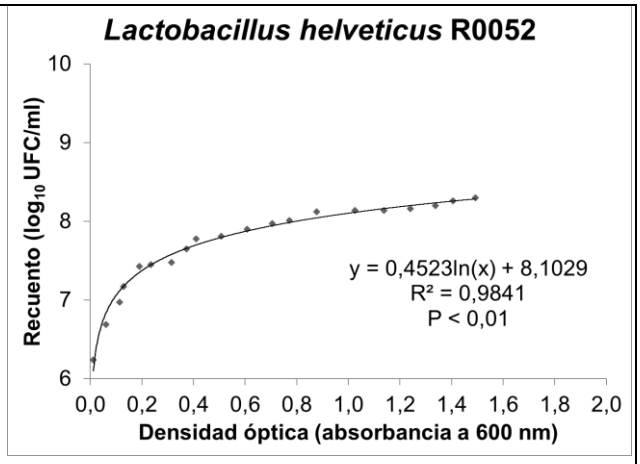
IV.1. Cuantificación de cepas.

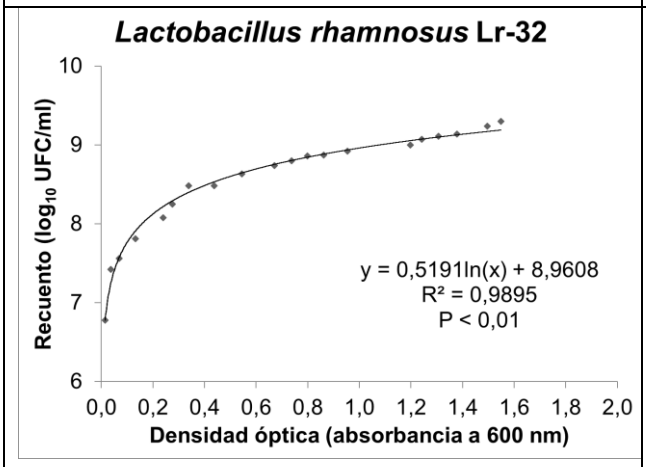
En general, las cepas mostraron muy buena capacidad para generar biomasa en un período corto de tiempo (12 h; 37°C; Tabla 8; Fig. 2). Todas alcanzaron más de 8 $\log_{10}$ UFC/ml en el tiempo evaluado. El modelo logarítmico utilizado ajustó significativamente ($P \leq 0,01$) y permitió cuantificar las cepas estudiadas. Las cepas con mayor número de células por unidad de volumen fueron *L. casei* Shirota, *E. faecium* MXVK29, *L. rhamnosus* R0011 y *L. rhamnosus* Lr-32.

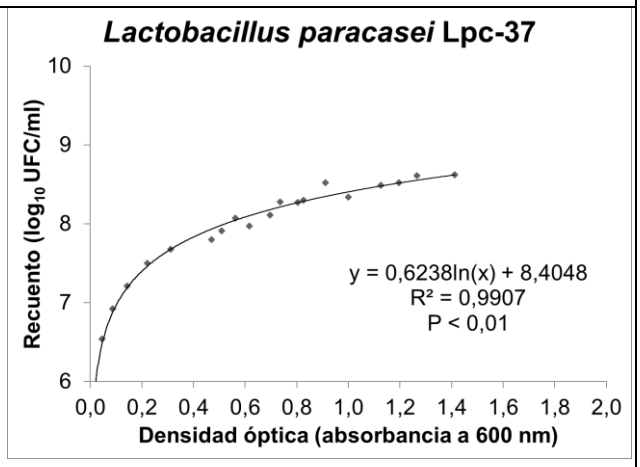
Fue importante el crecimiento que mostraron las cepas estudiadas, todas por encima de 8 $\log_{10}$ UFC/ml en 12 horas. Esta característica está relacionada con el poder de adaptación de los microorganismos al medio ambiente y su capacidad para desarrollarse rápidamente y es esencial cuando se producen productos probióticos, ya que deberían poder entregar una cantidad adecuada de organismos vivos que permitan los efectos de promoción de la salud (Rubio *et al*., 2014).

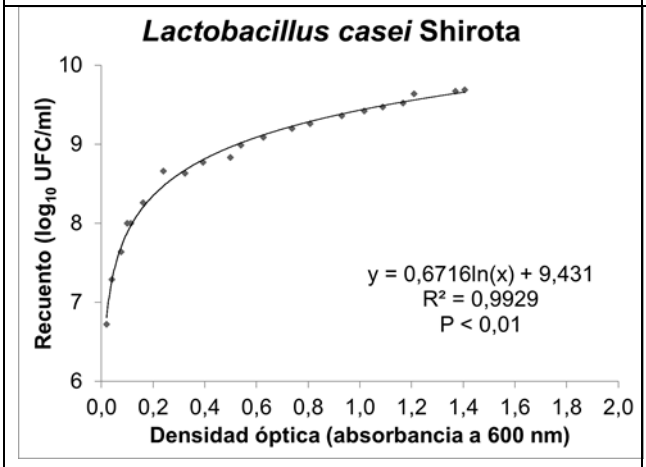
Además, cuando los microorganismos se incorporan a la masa para salames, deben crecer rápidamente y alcanzar grandes cantidades para volverse dominantes y competitivos frente a la microbiota autóctona presente en las materias primas (Drosinos *et al.*, 2005; Landeta *et al*., 2013; Sirini *et al*., 2021).

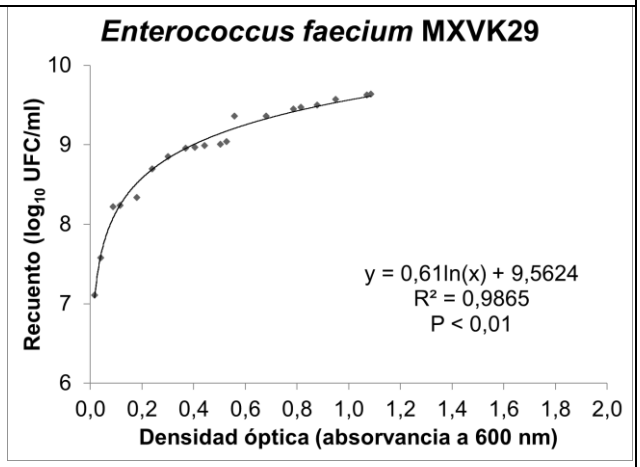

Lactobacillus rhamnosus R0011
Recuento (log_{10} UFC/ml)
Densidad óptica (absorbancia a 600 nm)
y = 0,4691ln(x) + 9,1504
R² = 0,9895
P < 0,01


Lactobacillus helveticus R0052
Recuento (log_{10} UFC/ml)
Densidad óptica (absorbancia a 600 nm)
y = 0,4523ln(x) + 8,1029
R² = 0,9841
P < 0,01


Lactobacillus rhamnosus Lr-32
Recuento (log_{10} UFC/ml)
Densidad óptica (absorbancia a 600 nm)
y = 0,5191ln(x) + 8,9608
R² = 0,9895
P < 0,01


Lactobacillus paracasei Lpc-37
Recuento (log_{10} UFC/ml)
Densidad óptica (absorbancia a 600 nm)
y = 0,6238ln(x) + 8,4048
R² = 0,9907
P < 0,01


Lactobacillus casei Shirota
Recuento (log_{10} UFC/ml)
Densidad óptica (absorbancia a 600 nm)
y = 0,6716ln(x) + 9,431
R² = 0,9929
P < 0,01


Enterococcus faecium MXVK29
Recuento (log_{10} UFC/ml)
Densidad óptica (absorvancia a 600 nm)
y = 0,61ln(x) + 9,5624
R² = 0,9865
P < 0,01

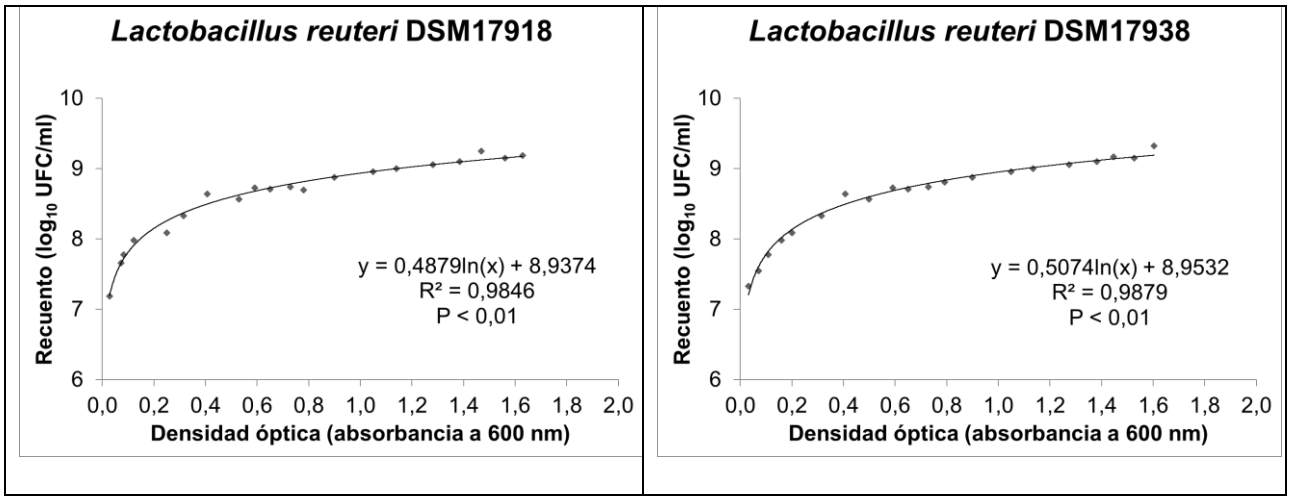


Figura 2. Curvas estándar de calibración utilizadas para cuantificar BAL probióticas.

IV.2. Producción de ácido y gas a partir de carbohidratos.

Todas las cepas probadas fermentaron la glucosa, produciendo ácido láctico sin generación de gas, lo que indica que su metabolismo es homofermentativo (Tabla 8; Fig. 3).

Para que se produzca el proceso de fermentación es necesaria la participación de BAL (dos Santos Cruxen *et al*., 2019). La capacidad de las bacterias lácticas, de producir grandes cantidades de ácido láctico, tiene como efecto la disminución del pH, considerado uno de los factores primarios en la inhibición de microorganismos indeseables, como alterantes, patógenos y bacterias coliformes, en alimentos (Wong-Villarreal *et al*., 2021).

El salame es un tipo de producto cárnico con sabor, color y textura especiales, además de una larga vida útil, que se elabora a partir de carne de cerdo y/o res mediante fermentación microbiana. El sabor del salame afecta en gran medida su calidad general y aceptabilidad sensorial. En comparación con la fermentación natural, la aplicación de cultivos iniciadores puede reducir la interferencia de factores ambientales y garantizar la estabilidad de las sustancias aromáticas. En particular, las bacterias del ácido láctico pueden reducir aún más la

acidez del salame a través de la actividad metabólica en la matriz cárnica, impartiendo un sabor único al producto (Liu *et al*., 2020).

La capacidad de las cepas estudiadas para producir solo ácido láctico a partir de carbohidratos fue muy importante. Las LAB heterofermentativas no son aptas para la producción de embutidos debido a la formación de dióxido de carbono, que se acumula en la matriz y genera agujeros de diferentes tamaños en el producto (Buckenhüskes, 1993; Milićević *et al*., 2021). Además, estas BAL producen concentraciones de ácido acético que provocan un fuerte sabor desagradable.

Figura 3. Fermentación de carbohidratos con producción de ácido sin generación de gas.

IV.3. Producción de ácido láctico.

La cantidad de ácido láctico producido por cada cepa se muestra en la Tabla 8 y Figura 4. La mayor concentración la generó el iniciador comercial *P. pentosaceus* PCFF-1 (P≤ 0,05), mientras que *L. reuteri* DSM 17918, *L. reuteri* DSM 17938 y *L. helveticus* R0052 tuvieron la producción más baja. Esto se relacionó con su baja capacidad de crecimiento a la temperatura de incubación de los ensayos (22°C), que se eligió porque es la temperatura de fermentación habitual de los embutidos en los que se pretende utilizar esta cepa en el futuro. Las cepas *L. rhamnosus* R0011, *L. rhamnosus* Lr-32, *L. paracasei* Lpc-37, *L. casei* Shirota y *E. faecium* MXVK29 generaron ácido láctico en el rango de 216 a 148 mM (Tabla 8).

La aptitud de las cepas iniciadoras para la acidificación rápida es una característica importante, ya que tiene un impacto en el sabor, la seguridad, el aroma, consistencia y las propiedades bacteriostáticas o bactericidas (Leroy *et al*., 2006; Liu *et al*., 2020; Milićević *et al*., 2021; Wong-Villarreal *et al*., 2021; Zagorec and Champomier-Vergès, 2017). La función principal de las BAL es reducir el pH de la matriz mediante la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de carbohidratos. La producción de ácidos en el salame depende del tipo y concentración de azúcares añadidos a la mezcla cárnica, del diámetro del salame y de la microbiota de las BAL (Rubio *et al*., 2014). Es necesaria una reducción del pH para que las proteínas fibrilares se coagulen, lo que mejora la firmeza y la cohesión del producto final, lo que facilita el corte (Drosinos *et al*., 2007; Ordoñez *et al*., 1999). También promueve la reducción espontánea de nitritos a óxido nítrico, que reacciona con la mioglobina para formar nitrosomyoglobina, el compuesto responsable del típico color rojo de los embutidos curados (Hugas and Monfort, 1997). Además, contribuye al sabor del producto final a través de la formación de su típico sabor ácido. La acidez que alcanza la matriz cárnica también contribuye a aumentar la actividad de la catepsina D, responsable de la proteólisis muscular (Molly *et al*., 1997). La producción de ácidos orgánicos es sin duda el factor determinante del que depende la vida útil y la seguridad del producto (Wong-Villarreal *et al*., 2021). La inhibición de patógenos y microbiota de deterioro también depende de una producción rápida y adecuada de ácidos orgánicos y la reducción

asociada en el pH (dos Santos Cruxen *et al*., 2019; Wong-Villarreal *et al*., 2021). Finalmente, se ha informado que la rápida disminución del pH causada por cultivos aminodecarboxilasa negativos disminuye la producción de aminas biogénicas en salames (Maijala *et al*., 1993). La formación inmediata y rápida de ácido al inicio del proceso de fermentación, y la producción de cantidades suficientes de ácidos orgánicos que permitan alcanzar un pH inferior a 5,1 es un requisito esencial de la BAL iniciadora. Sin embargo, la formación excesiva de ácido a menudo se asocia con defectos de color (debido a la inhibición de los CCNs) y, a veces, con la formación de gas (en el caso de las bacterias heterofermentativas), uno de los problemas más importantes en el procesamiento de salames (Buckenhüskes, 1993). Comparando los resultados de este trabajo con los obtenidos por Erkkilä *et al*. (2001b) se puede suponer que las cepas estudiadas produjeron suficiente ácido láctico para actuar como el principal microorganismo iniciador en la producción de salames. El sabor ácido de los productos cárnicos fermentados, que se correlaciona con el contenido de ácido, es apreciado en algunos países mientras que en otros es indeseable (Rubio *et al*., 2014). Por lo tanto, la producción de ácido, es un factor importante para la selección de cepas como cultivos iniciadores en embutidos fermentados considerando además las características del producto a elaborar.

Debido a la acidificación la microbiota de BAL desempeña un papel esencial como cultivo iniciador en la fermentación de la carne (Milićević *et al*., 2021).

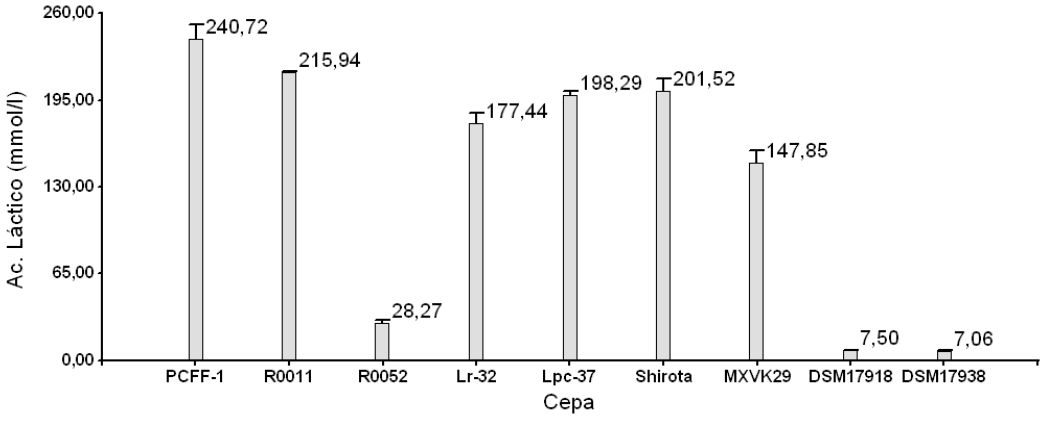


Figura 4. Ácido láctico producido (mM) en caldo MRS luego de incubar por 48 h a 22°C.

IV.4. Efecto de la temperatura en el crecimiento de BAL probióticas.

Los resultados de la Tabla 8 muestran que a 7°C *L. helveticus* R0052, *L. reuteri* DSM17918 y *L. reuteri* DSM17938 no incrementaron su biomasa; *L. rhamnosus* Lr-32 tuvo un desarrollo lento pero la cepa permaneció viable y se observó un aumento en el día 15 del período de incubación. Entre 30 y 37°C, la temperatura más característica de la fermentación de los productos cárnicos centroeuropeos, todas las cepas tuvieron un buen crecimiento, lo que indica que son mesófilas y que corresponde a su temperatura óptima de crecimiento. A 43°C las cepas *L. rhamnosus* R0011, *L. rhamnosus* Lr-32, *E. faecium* MXVK29, *L. helveticus* R0052, *L. reuteri* DSM17918 y *L. reuteri* DSM17938 tuvieron un buen crecimiento. Las tres primeras de las cepas anteriores mostraron un amplio rango óptimo de temperaturas de crecimiento. Para *L. helveticus* R0052, *L. reuteri* DSM17918 y *L. reuteri* DSM17938 el rango fue más estrecho y se estableció solo en los niveles óptimos de crecimiento de bacterias mesófilas. *L. paracasei* Lpc-37 y *L. casei* Shirota no crecieron a alta temperatura (Tabla 8).

La temperatura de elaboración de los embutidos cárnicos fermentados oscila entre 4 y 7°C cuando se prepara la mezcla, sube entre 18 y 24°C durante el periodo de fermentación y se reduce de 12 a 15°C durante el periodo de secado y maduración (Ammor and Mayo, 2007; Montel, 1999). Por lo tanto, es necesario seleccionar cepas de BAL que sean capaces de desarrollarse en un amplio rango de temperaturas (dos Santos Cruxen *et al*., 2019). En el rango de temperatura de la típica fermentación mediterránea (15- 22°C), que también se utiliza generalmente en la industria cárnica Argentina, las cepas *L. rhamnosus* R0011, *L. rhamnosus* Lr-32, *L. paracasei* Lpc-37, *L. casei* Shirota y *E. faecium* MXVK29 fueron las que mejor se adaptaron y desarrollaron.

En estudios de salames elaborados por Milićević *et al*., (2021) mostraron que aislamientos de cepas de lactobacilos son capaces de crecer a temperatura de 15°C.

IV.5. Efecto del pH, nitrito de sodio y cloruro de sodio en la supervivencia y crecimiento de BAL.

Las cepas *L. rhamnosus* Lr-32, *L. reuteri* DSM17918 y *L. reuteri* DSM17938 fueron las que mejor se adaptaron a las condiciones de fermentación simulada (pH 4,5, NaCl 2% y $NaNO_2$ 100 mg/l). Los valores de Nmax de estas cepas fueron similares y, a su vez, mayores y diferentes al resto de las cepas estudiadas ($P \leq 0,05$). Por el contrario, se observó que *E. faecium* MXVK29 no logró desarrollarse en las condiciones estudiadas (Tabla 8, Fig. 5). Por otro lado, en la etapa de maduración (pH 5,5, NaCl 3% y $NaNO_2$ 200 mg/l) se puede observar que *L. rhamnosus* Lr-32 y *L. rhamnosus* R0011, *L. paracasei* Lpc-37, *L. reuteri* DSM17918 y *L. reuteri* DSM17938 tuvieron los valores más altos de Nmax ($P \leq 0,05$) (Tabla 8, Fig. 5).

El crecimiento de las cepas BAL en las condiciones de fermentación y maduración de los embutidos es determinante para que puedan ser considerados como potenciales iniciadores. Las cepas estudiadas mostraron una respuesta adaptativa diferente a las condiciones de fermentación y maduración estudiadas. Tres de las cepas estudiadas (*L. reuteri* DSM 17938, *L. reuteri* DSM 17918 y *L. rhamnosus* Lr-32) mostraron el mejor desempeño en ambas condiciones. La concentración de sal añadida a la pasta del embutido crudo-curado, aproximadamente un 2% dependiendo de cada producto, puede llegar hasta 2,5-3,5 p/p en el producto final (Ruiz-Moyano *et al*., 2008). La capacidad de las BAL para tolerar la sal está bien establecida en varias cepas de BAL, ya que algunas BAL pueden soportar concentraciones aún mayores de aditivos químicos sin comprometer su capacidad de crecimiento (Hadinia *et al*., 2022). En estudios de salames elaborados por Milićević *et al*., (2021) mostraron que aislamientos de cepas de lactobacilos son capaces de crecer a concentraciones de sal de 5%, 6% y 8%. El pH inicial de la mezcla, que suele rondar los 6, va disminuyendo durante la fermentación y alcanza valores entre 4,6- 5,1. Posteriormente, los hongos pueden aumentar el pH del producto, alcanzando valores finales que oscilan entre 5,1 y 5,5 (Ammor and Mayo, 2007; Ruiz-Moyano *et al*., 2008). El crecimiento bacteriano en matrices alimentarias puede verse afectado por factores intrínsecos y extrínsecos.

Por lo tanto, es necesario seleccionar cepas de BAL que sean capaces de desarrollarse tolerando condiciones adversas incluyendo la presencia de cloruro de sodio, nitrito de sodio y pH ácido, siendo fundamental que se adapten adecuadamente a las condiciones de la matriz alimentaria. Así, las cepas anteriores presentarán una mayor capacidad de persistencia durante la fermentación de los alimentos (dos Santos Cruxen *et al*., 2019). El desarrollo de un nuevo producto cárnico fermentado probiótico requiere la aplicación de bacterias probióticas que sean resistentes a la sal, el nitrito y el pH ácido, para que puedan activarse y crecer rápidamente durante la fermentación y la maduración (Papamanoli *et al*., 2003). Esto permitirá la competencia con la microbiota natural y dará como resultado una fermentación exitosa. Además, al producir alimentos funcionales con cultivos probióticos, es necesario que el producto contenga una cantidad suficientemente alta de células viables al momento del consumo, que debe exceder la dosis mínima sugerida para proporcionar beneficios para la salud. Este es un requisito previo para ejercer efectos beneficiosos sobre el huésped (Ruiz-Moyano *et al*., 2008). La tolerancia a la alta concentración de sal y la rápida acidificación constituyen funciones claves para un papel importante de los organismos en la fermentación de la carne (Rubio *et al*., 2014).

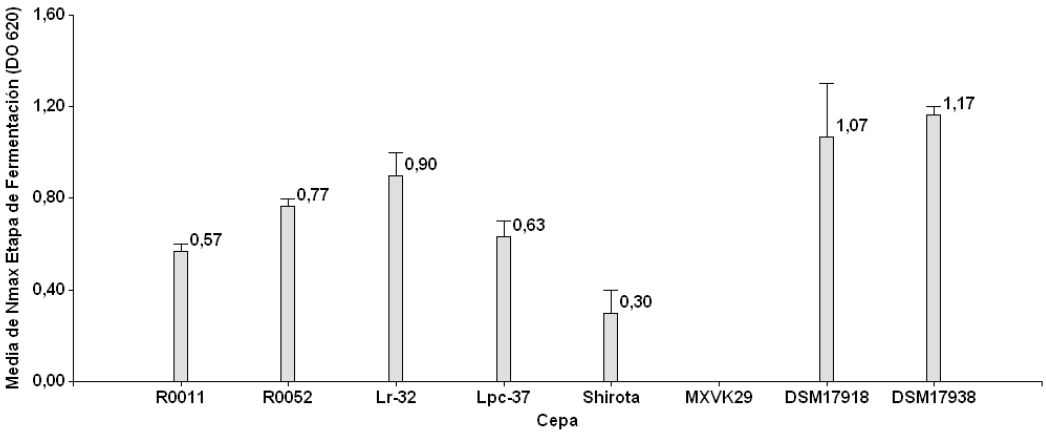


Figura 5. Crecimiento de cepas en medio de cultivo que simula la etapa de fermentación de un salame.

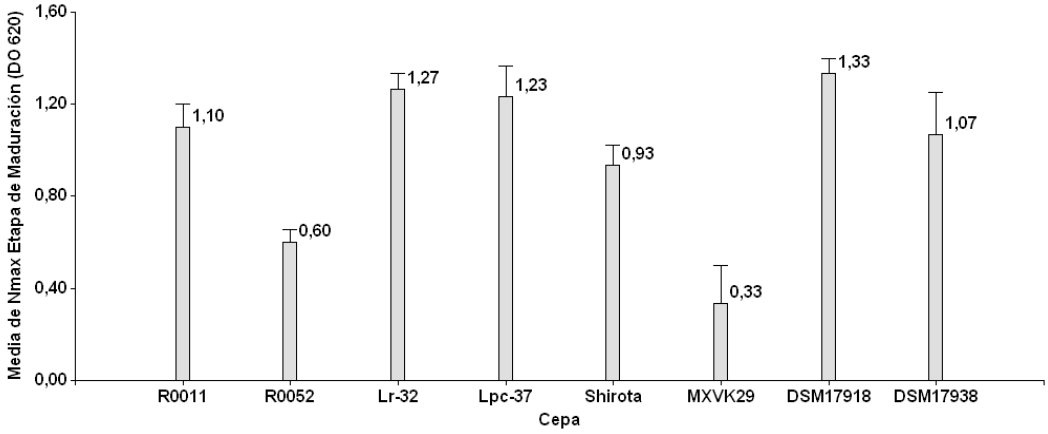


Figura 6. Crecimiento de cepas en medio de cultivo que simula la etapa de maduración de un salame.

IV.6. Caracterización enzimática.

IV.6.1. Producción de peróxido de hidrógeno.

Las cepas productoras de peróxido de hidrógeno mostraron que sus colonias blancas se tornan de color azul claro (en el caso de *P. pentosaceus* PCFF-1, *L. plantarum* Lp-UCC, *L. sakei* Ls-UCC y *L. casei* Shirota) (Tabla 8, Fig. 7) y azul intenso, indicando una alta producción de peróxido de hidrógeno, (para *L. helveticus* R0052, *L. reuteri* DSM17918 y *L. reuteri* DSM17938) (Tabla 8, Fig. 8).

La mayoría de los lactobacilos son capaces de formar peróxido de hidrógeno a través de la enzima lactato oxidasa durante la fermentación de salames. El peróxido de hidrógeno puede interferir con las propiedades organolépticas de los productos cárnicos fermentados al aumentar el enranciamiento debido a la oxidación de lípidos (dos Santos Cruxen *et al*., 2019) y pueden generar la decoloración del producto final (Ammor and Mayo, 2007). Ensayos de autores informaron que *L. plantarum* y *L. sakei* son capaces de producir peróxido de

hidrógeno, que es un agente oxidante, y se sugirió que tales cepas podrían estar relacionadas con defectos en el color y el sabor de los salames (Papamanoli *et al*., 2003; Talon *et al*., 2000). Teniendo en cuenta lo anterior, *L. helveticus* R0052, *L. casei* Shirota, *L. reuteri* DSM17918 y *L. reuteri* DSM17938 no serían las cepas más adecuadas para ser utilizadas como iniciadores de embutidos. Sin embargo, también se debe considerar que las cepas de BAL serán parte de un cultivo iniciador mixto y que los CCNs son capaces de lisar el peróxido de hidrógeno producido (dos Santos Cruxen *et al*., 2019).

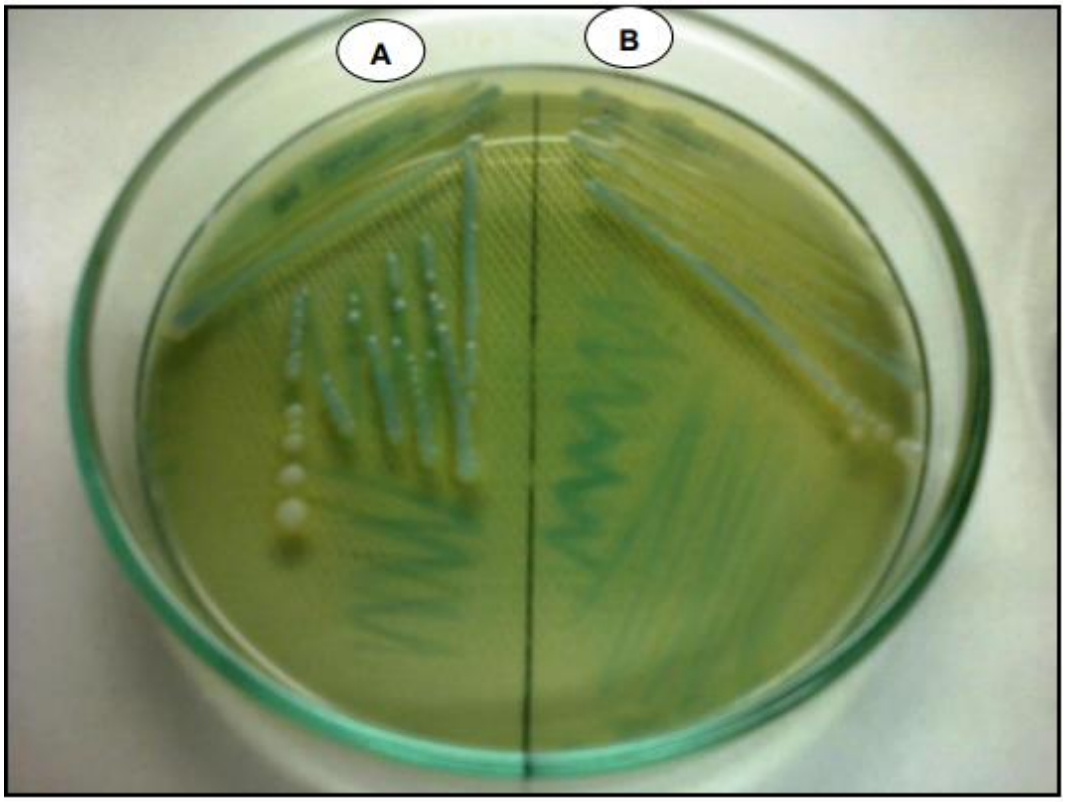


Figura 7. Baja producción de peróxido de hidrógeno.

Fig. 1. A. Cepa de *P. pentosaceus* PCFF-1. Fig. 1. B. Cepa de *L. casei* Shirota.

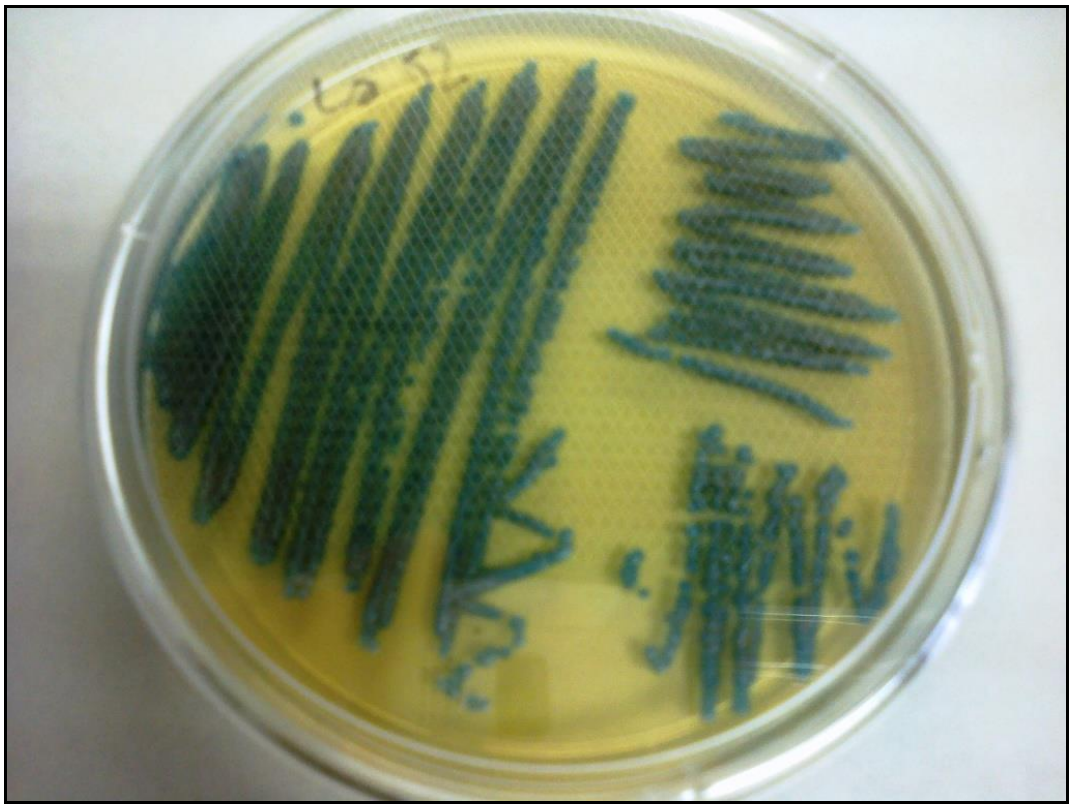


Figura 8. Alta producción de peróxido de hidrógeno.

Cepa de *L. helveticus* R0052.

IV.6.2. Actividad catalasa e hidrólisis del peróxido de hidrógeno.

Todas las cepas fueron negativas para la actividad de catalasa y no se observó que degradaran el H_2O_2 (Tabla 8).

Algunas cepas de BAL involucradas en la fermentación de la carne como *L. sakei*, *L. plantarum*, *L. pentosus* y *P. acidilactici* tienen actividad catalasa hemo-dependiente que es activa en productos cárnicos, ya que estos sustratos contienen abundante hemina (Ammor and Mayo, 2007; Milićević *et al*., 2021). Si bien todas las cepas probióticas estudiadas fueron catalasa negativas y su actividad de BAL utilizada como cultivos iniciadores en carnes, es una propiedad deseable (Ammor and Mayo, 2007), no es esencial ya que esta función la realizan los CCNs (dos Santos Cruxen *et al*., 2019; Milićević *et al*., 2021) que forman parte del cultivo iniciador. Los CCNs pueden neutralizar las moléculas prooxidantes, limitando los

procesos oxidativos basados en su superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) (dos Santos Cruxen *et al*., 2019).

IV.6.3. Reducción de nitratos y nitritos.

Todas las cepas fueron negativas para la actividad nitrato reductasa y no se observó que redujeran los nitratos (Tabla 8).

Aunque varios autores han informado que algunas BAL de carne tienen nitrato reductasas (Ammor and Mayo, 2007; Hammes *et al*., 1990; Wolf *et al*., 1990), las cepas probióticas probadas no redujeron los nitratos, pero las especies de cocos Gram-positivos contribuyen a la formación de las características típicas de los productos cárnicos fermentados, como el color. La nitrato reductasa confiere un color característico al producto (dos Santos Cruxen *et al*., 2019). Y la BAL probiótica formará parte de un cultivo iniciador mixto junto con un micrococo.

Un estudio reciente ha demostrado que la cepa *L. plantarum* tiene el potencial de reducir los riesgos de nitrito. Esta cepa tiene actividades de nitrato y nitrito reductasa. La combinación de *L. plantarum* y bajos niveles de nitrito de sodio representa una estrategia potencial para producir salames más saludables y de alta calidad mediante la reducción de nitritos (Zhu *et al*., 2020).

IV.6.4. Hidrólisis de la caseína de la leche.

Los probióticos *L. rhamnosus* R0011, *L. rhamnosus* Lr-32, *L. paracasei* Lpc-37, *L. casei* Shirota y *E. faecium* MXVK29 hidrolizaron la caseína de leche generando un halo transparente alrededor de las colonias (Tabla 8, Fig. 9).

En estudios realizados por Farkhondeh *et al*. (2023) mostraron que cepas de *E. faecium* tienen gran actividad proteolítica.

Los cultivos iniciadores afectan el aroma y el sabor de los productos cárnicos fermentados y el uso de su patrón enzimático como criterio de selección podría ser de interés (Papamanoli *et al*., 2003). Cinco de las cepas estudiadas mostraron su capacidad proteolítica, lo que resulta interesante como propiedad tecnológica. Esta es una característica deseable, que podría contribuir al catabolismo de proteínas mediante la generación de precursores de los compuestos del sabor de los salames (Ammor and Mayo, 2007), esta actividad está asociada con el desarrollo del sabor (Chen *et al*., 2015).

Debido a la proteólisis la microbiota de BAL desempeña un papel esencial como cultivo iniciador en la fermentación de la carne (Milićević *et al*., 2021).

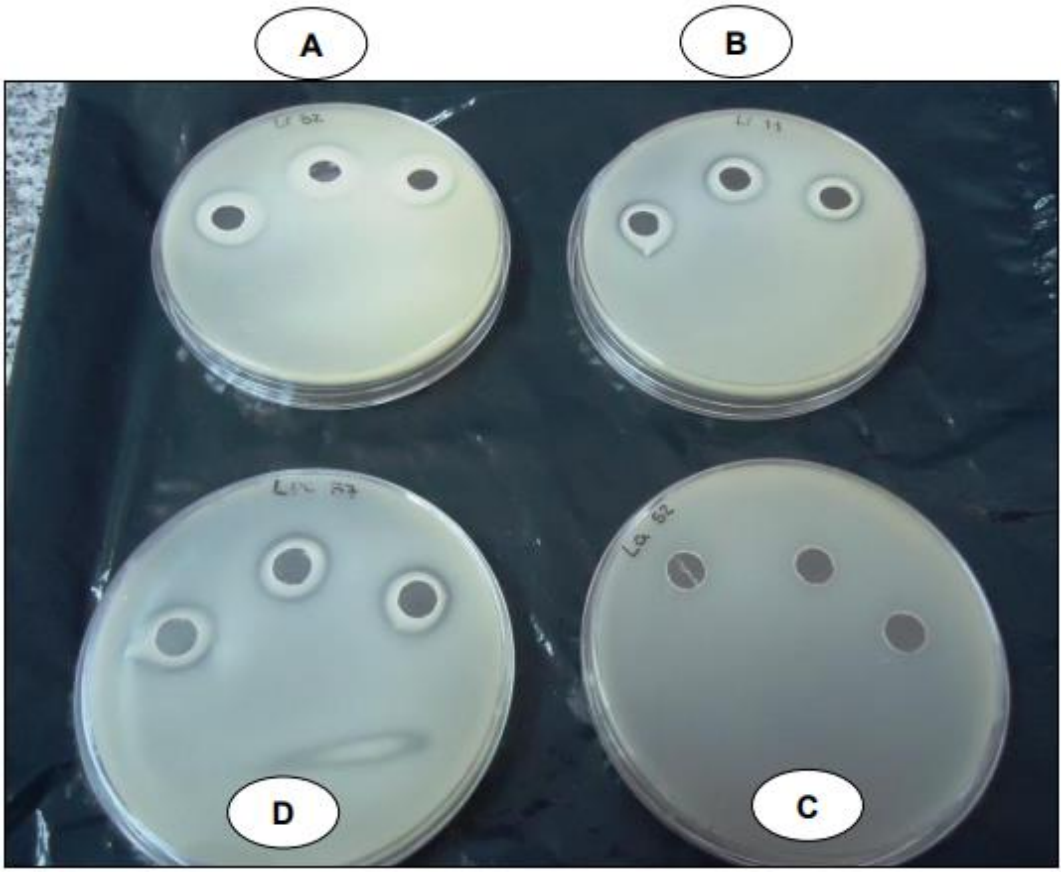


Figura 9. Hidrólisis de la caseína de la leche.

Fig.1. A. *L. rhamnosus* Lr-32. Fig. 1. B. *L. rhamnosus* R0011. Fig.1. C. *L. helveticus* R0052. Fig. 1. D. *L. plantarum* Lpc-37.

IV.6.5. Actividad lecitinasa y lipasa.

Los probióticos *L. rhamnosus* R0011, *L. rhamnosus* Lr-32, *L. paracasei* Lpc-37, *L. casei* Shirota y *E. faecium* MXVK29 hidrolizaron los triglicéridos, mostrando un brillo aceitoso en las colonias y alrededor de ellas (Tabla 8, Fig. 10 y 11). En estudios realizados por Farkhondeh *et al*. (2023) mostraron que cepas de *E. faecium* tienen gran actividad lipolítica.

Como se mencionó anteriormente, los cultivos iniciadores afectan el aroma y el sabor de los productos cárnicos fermentados y puede ser de interés el uso de su patrón enzimático como criterio de selección (Papamanoli *et al*., 2003). Cinco de las cepas estudiadas mostraron su capacidad lipolítica lo que resulta interesante como propiedad tecnológica. Esta es una característica deseable, que podría contribuir al catabolismo de grasas generando precursores de los compuestos del sabor de los salames (Ammor and Mayo, 2007), esta actividad está asociada con el desarrollo del sabor (Chen *et al*., 2017).

Debido a la lipólisis la microbiota de BAL desempeña un papel esencial como cultivo iniciador en la fermentación de la carne (Milićević *et al*., 2021).

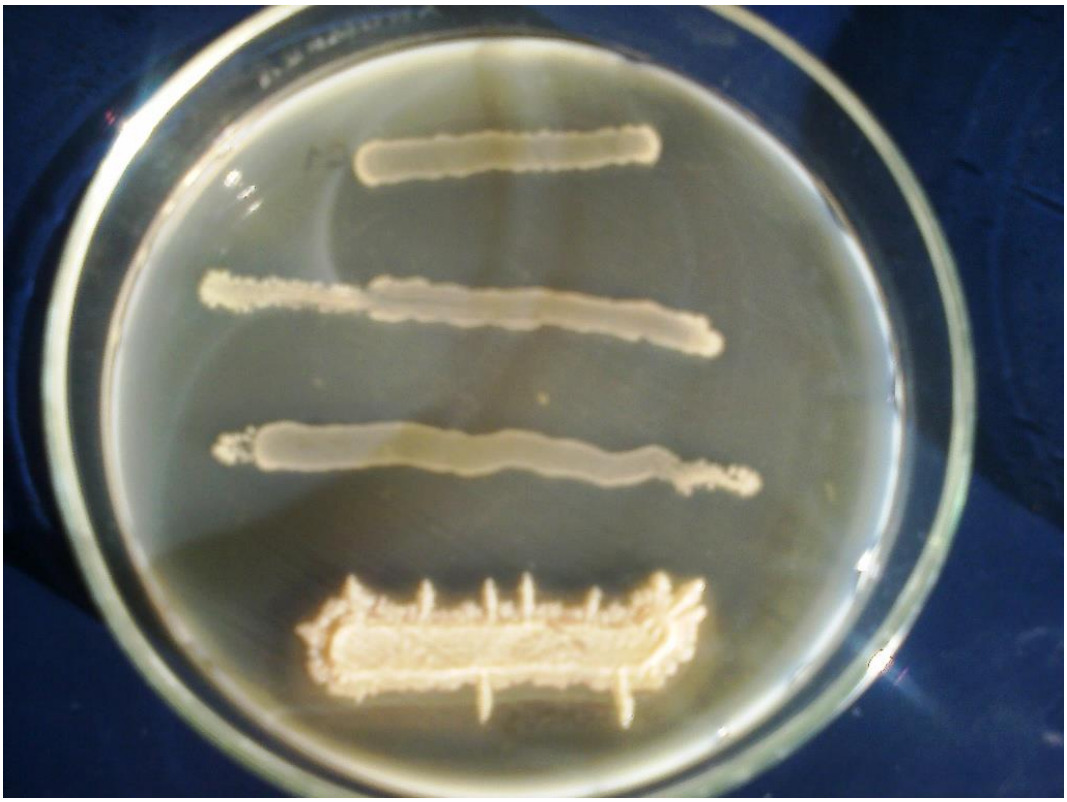


Figura 10. Hidrólisis de ácidos grasos.

Agar Triptona de soya inoculado con *L. rhamnosus* Lr-32.

Figura 11. Hidrólisis de ácidos grasos.

Agar Cerebro Corazón Infusión inoculado con *L. rhamnosus* Lr-32.

IV.7. Antagonismo contra *Staphylococcus xylosus.*

Las cepas probióticas estudiadas no mostraron halos de inhibición frente a *S. xylosus* DD-34 (una cepa CCN comúnmente utilizada en la industria cárnica) (Tabla 8).

Como se mencionó anteriormente, los cultivos iniciadores de productos cárnicos son principalmente una mezcla de cepas BAL y CCN, y se han utilizado como iniciadores comerciales durante muchos años para la elaboración de salames en diferentes países del mundo (Rubio *et al*., 2014). Para llevar a cabo las funciones esperadas es necesario que la cepa BAL iniciadora muestre tolerancia o incluso sinergismo con la cepa CCN que forma parte del cultivo iniciador (Ammor and Mayo, 2007). Por lo tanto, los resultados obtenidos indican que las cepas probióticas estudiadas podrían combinarse con *S. xylosus* DD-34 formando así un cultivo iniciador mixto para ser utilizado en la preparación de salames probióticos. Se ha demostrado que algunos de estos estafilococos coagulasa negativos podrían afectar tanto el crecimiento como las actividades proteolíticas de las cepas de BAL. Tales interacciones son por lo tanto de interés y deben ser consideradas para la selección de iniciadores con el fin de mejorar las propiedades organolépticas de los embutidos fermentados (Tremonte *et al*., 2010).

Los cultivos iniciadores contribuyen a las propiedades funcionales de los productos fermentados y desempeñan un papel importante en la mejora de las características organolépticas, tecnológicas, nutricionales y sanitarias de los embutidos fermentados (Laranjo *et al*., 2019). Se pueden utilizar diferentes tipos de microorganismos (BAL, estafilococos y micrococos, mohos y levaduras) para cultivos iniciadores autóctonos y comerciales en la producción de embutidos fermentados.

La combinación de *Lactobacillus* spp. y *Staphylococcus* spp. utilizados como cultivos iniciadores en la producción de salames pueden contribuir al agradable aroma y sabor de los salames y poseen propiedades antimicrobianas contra microorganismos no deseados y patógenos (Milićević *et al*., 2021).

Los cocos gram positivos utilizados como cultivos iniciadores (*Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosus* y *Micrococcus varians*)

desempeñan un papel importante en la reducción de nitratos y nitritos, descomposición de peróxidos, estabilización de la lipólisis y desarrollo de textura. *S. carnosus* y *S. xylosus* como cultivos iniciadores contribuyen al desarrollo del color y aroma deseables en los salames. Debido a sus propiedades antioxidantes, su crecimiento en concentraciones óptimas de sal y su crecimiento en un pH óptimo, *S. carnosus* y *S. simulans* se utilizan a menudo como iniciadores en salames (Milićević *et al*., 2021).

IV.8. Descarboxilación de aminoácidos.

Las cepas *L. rhamnosus* R0011, *L. rhamnosus* Lr-32 y *L. paracasei* Lpc-37 no descarboxilaron ninguno de los aminoácidos testeados. Sin embargo, las otras cepas probadas descarboxilaron al menos un aminoácido después de 24 o 36 h (Tabla 5, Fig. 12).

Las aminas biogénicas (AB) son bases orgánicas de bajo peso molecular, compuestos polares o semipolares, resultantes de la descarboxilación de aminoácidos (Papageorgiou *et al*., 2018; Roselino *et al*., 2020), el salame ocasionalmente puede acumular altas concentraciones de estos compuestos. El contenido de AB en los alimentos está relacionado con las materias primas, la microbiota alimentaria o cultivo iniciador utilizado y las condiciones de procesamiento y almacenamiento. Estos compuestos generalmente no son tóxicos, pero cuando son ingeridos en grandes cantidades por personas con enfermedades gastrointestinales o incapaces de desintoxicarse debido a problemas genéticos y/o combinados con la ingestión de alcohol, pueden causar náuseas, diarrea e hiperdilatación de los vasos sanguíneos (Kamal *et al*., 2022; Papageorgiou *et al*., 2018; Roselino *et al*., 2020). Las AB más frecuentes en alimentos y bebidas son histamina, tiramina, putrescina, cadaverina y β-feniletilamina (Papageorgiou *et al*., 2018; Roselino *et al*., 2020). El nitrito residual presente en los salames puede reaccionar con las aminas y formar nitrosaminas cancerígenas (De Mey *et al*., 2014; Sallan *et al*., 2023). En los salames, las AB ocurren debido al uso de

materias primas de baja calidad, disponibilidad de aminoácidos libres, falta de buenas prácticas de fabricación, almacenamiento inadecuado, y presencia de microorganismos descarboxilasa positivos (Kamal *et al*., 2022; Stadnik and J Dolatowski, 2010). Así, la incorporación de cultivos iniciadores específicos, capaces de inhibir microorganismos con actividad de aminoácidos descarboxilasa, se ha indicado como una forma de reducir los niveles de AB en el salame. Los resultados indican un bajo riesgo toxigénico de los microorganismos estudiados para generar aminas biogénicas, especialmente las cepas probióticas, que no descarboxilaron ninguno de los aminoácidos ensayados. Estudios previos han informado sobre la desaminación de la arginina por cepas de *L. sakei,* pero no por cepas de *L. plantarum* (Hugas *et al*., 1993; Papamanoli *et al*., 2003). Otros autores informaron de la formación de aminas biogénicas tanto por cepas de *L. plantarum* como de *L. sakei* (Ruiz-Moyano *et al*., 2009).

En un estudio realizado por Roselino *et al*., (2020), el uso de *Enterococcus faecium* CRL 183 como cultivo iniciador en la producción de salame, controló los niveles de AB nocivas durante el período de almacenamiento, representando una alternativa para el mercado para obtener productos cárnicos fermentados más saludables.

La ausencia de formación de AB se ha propuesto como criterio de selección para nuevas cepas utilizadas como cultivos iniciadores para carnes (Ammor and Mayo, 2007; Buckenhüskes, 1993; Roselino *et al*., 2020; Ruiz-Moyano *et al*., 2009). El rápido crecimiento y producción de ácido evitará aún más el desarrollo de una microbiota autóctona que produzca aminas (Ammor and Mayo, 2007). Además, otros estudios indican que el uso de cultivos iniciadores negativos para amino descarboxilasa reduce significativamente los niveles de aminas biogénicas formadas en salames (Erkkilä *et al*., 2001a; Maijala *et al*., 1995; Sirini *et al*., 2021). Esta actividad ya ha sido descrita en algunas BAL para la fermentación de embutidos, como *L. plantarum* y *L. casei* (Fadda et al., 2001; Sirini et al., 2021; Zhu et al., 2020). Los microorganismos más prometedores utilizados como cultivos iniciadores son los microorganismos identificados, previamente caracterizados como seguros y que exhiben la actividad metabólica deseada (Leroy and De Vuyst, 2004). En base a estos conceptos, los probióticos estudiados *L. rhamnosus* R0011, *L. rhamnosus* Lr-32 y *L. paracasei* Lpc-37 serían los principales candidatos para ser utilizados como cultivo iniciador en la elaboración de un salame saludable y

seguro. La calidad de los alimentos es un requisito importante para garantizar la seguridad y la salud de los consumidores en todo el mundo. Para lograr este objetivo es necesario un estricto control de los contaminantes biológicos, físicos y químicos de los alimentos. Se utilizan AB, formados principalmente por descarboxilación microbiana de aminoácidos como indicadores de la descomposición de los alimentos (Roselino *et al*., 2020).

Tabla 5. Descarboxilación de aminoácidos.

Cepa en estudio	Tiempo (h)																													
	12 horas					24 horas					36 horas					48 horas					60 horas					72 horas				
	Arg.	His.	Lis.	Tir.	Trip.	Arg.	His.	Lis.	Tir.	Trip.	Arg.	His.	Lis.	Tir.	Trip.	Arg.	His.	Lis.	Tir.	Trip.	Arg.	His.	Lis.	Tir.	Trip.	Arg.	His.	Lis.	Tir.	Trip.
PCFF-1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N
Lp-UCC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N
Ls-UCC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N
R0011	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
R0052	N	N	N	N	N	SC	N	N	N	N	SC	N	N	N	N	SC	P	N	N	N	SC	P	N	N	N	SC	P	N	N	N
Lr-32	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Lpc-37	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Shirota	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	P	N	N	N
MXVK29	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	P	P	N	P	N
DSM17918	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	P	P	N	N	N	P	P	N	N	N	P	P	N	N	N
DSM17938	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	P	P	N	N	N	P	P	N	N	N	P	P	N	N	N

Referencias: Arg: arginina; His: histidina; Lis: lisina; Tir: tirosina; Trip: triptófano

Producción: P: cepa descarboxilante del aminoácido utilizado.
N: cepa no descarboxilante del aminoácido utilizado.
SC: cepa sin crecimiento en el medio.

Figura 12. Descarboxilación de aminoácidos.
El color amarillo de los tubos indica que la cepa no es capaz de descarboxilar el aminoácido testeado. Los tubos de color púrpura indican que la cepa puede descarboxilar el aminoácido testeado.

IV.9. Antagonismo contra patógenos asociados a salames.

La Tabla 6 muestra los resultados de la prueba de la mota en el césped. Aquí se puede observar que todas las cepas probióticas probadas generaron halos de inhibición frente a los patógenos *L. monocytogenes* y *S. aureus*. A excepción de *L. helveticus* R0052, los probióticos formaron halos de inhibición contra *E. coli* y Salmonella dublin. En la técnica de difusión en agar, solo la cepa de *E. faecium* MXVK29 pudo inhibir *L. monocytogenes* tanto en ELC no neutralizado como neutralizado (Fig. 13). Este resultado de inhibición de *E. faecium* MXVK29 contra listeria coinciden con estudios realizados por Alvarez-Cisneros *et al*. (2010). La Tabla 7 muestra los resultados del antagonismo microbiano en microplaca. El ELC

de los diferentes probióticos produjo un menor crecimiento de *E. coli*, Salmonella dublin y *S. aureus* (P≤ 0,05). La cepa *L. casei* Shirota tuvo el mayor efecto antagónico contra *S. aureus*. Las cepas *L. paracasei* Lpc-37, *E. faecium* MXVK29 y *L. reuteri* DSM17918 inhibieron fuertemente el crecimiento de Salmonella dublin mientras que *E. faecium* MXVK29 y *L. reuteri* DSM17938 fueron las cepas con mayor inhibición frente a *E. coli*. No hubo diferencia significativa (P≤ 0,05) en el crecimiento de *L. monocytogenes* en el medio control con respecto a los medios que contenían ELC de *L. rhamnosus* R0011 y *L. helveticus* R0052. Por el contrario, sí lo hubo con el ELC de los demás probióticos ensayados y se evidenció un pronunciado efecto de inhibición en el medio que contenía ELC de la cepa *L. reuteri* DSM17938.

En la Tabla N°8 se muestran los resultados finales de antagonismo contra patógenos.

Se sabe que las BAL promueven la seguridad y la calidad de los alimentos porque presentan actividad antagónica contra los microorganismos que ocasionan deterioro y los microorganismos patógenos (da Costa *et al*., 2018). Además del uso como microorganismo iniciador, basado principalmente en la capacidad de acidificación, la capacidad antibacteriana demostrada por las cepas estudiadas podría ayudar a desarrollar propiedades de bioconservación en productos cárnicos fermentados secos. Estos enfoques parecen prometedores para el desarrollo futuro de la bioconservación para mejorar la vida útil y la seguridad de los productos cárnicos (Zagorec and Champomier-Vergès, 2017). La actividad antagónica puede ocurrir a través de varios mecanismos, incluida la competencia por nutrientes y sitios de adhesión, así como la producción de compuestos bactericidas como ácidos orgánicos (láctico, acético y propiónico), dióxido de carbono, diacetilo, peróxido de hidrógeno, reuterina y bacteriocinas (da Costa *et al*., 2018). El principal efecto antimicrobiano de las BAL responsables de la bioconservación de los alimentos es su capacidad acidificante. Sin embargo, las bacteriocinas producidas por BAL pueden proporcionar un control adicional contra los patógenos en los salames (dos Santos Cruxen *et al*., 2019). Las bacteriocinas son compuestos proteicos degradables enzimáticamente.

Cepas de *L. sakei*, *L. curvatus*, *L. plantarum* y *L. paracasei*, que a menudo se utilizan como cultivos iniciadores, contribuyen a la seguridad y estabilidad de los

salames debido a su fuerte actividad antibacteriana contra Escherichia coli y Listeria monocytogenes (Milićević *et al*., 2021).

En un estudio realizado por Bungenstock *et al*., (2020) se observó una alta actividad antibacteriana contra *Listeria* spp. por numerosas bacteriocinas derivadas de BAL, como pediocina, nisina y sakacina. Por lo tanto, esas cepas o preparados derivados de bacteriocinas generalmente parecen ser muy adecuados para su aplicación en alimentos con un alto riesgo de contaminación por *Listeria* spp.

El uso de un cultivo iniciador capaz de reducir o inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos asociados al salame contribuiría a garantizar la seguridad del producto. La capacidad de inhibir patógenos capaces de producir enfermedades transmitidas por los alimentos es una cualidad de interés para los iniciadores utilizados en la elaboración de productos cárnicos crudo-curados (Buckenhüskes, 1993). Aunque este efecto suele estar restringido a un número limitado de microorganismos, se espera un amplio efecto inhibitorio en cepas ya caracterizadas como las utilizadas en este trabajo. Más allá de esta característica, la atención se centró en la inactivación de patógenos, ya que las cepas probióticas con propiedades adicionales de seguridad alimentaria podrían conferir valor agregado a los productos cárnicos fermentados saludables.

Tabla 6. Actividad antimicrobiana (técnica de la mota en el césped) de cepas probióticas frente a patógenos asociados a salames.

Cepa objetivo	Cepa inhibidora															
	Diámetro de colonia (mm)								Diámetro de halo de la zona de inhibición (mm)							
	R0011	R0052	Lr-32	Lpc-37	Shirota	MXVK29	DSM17918	DSM17938	R0011	R0052	Lr-32	Lpc-37	Shirota	MXVK29	DSM17918	DSM17938
S. aureus	7	6,5	8	7,5	7	6,5	8	7,5	14	4	12	14	9	7	10	11
L. monocytogenes	7	6	9	8	7	7	9	8	15	5	12	15	13	15	7	8
Salmonella dublin	5	5	7	7	7	5	7	7	12	nd	16	14	16	12	11	10
E. coli	5	5	6,5	7	6	6	7	6,5	12	nd	12	17	11	8	8	10

Diámetro promedio de colonias (mm) y halos de inhibición de cepas probióticas cuando se enfrenta a patógenos alimentarios asociados a salames.

nd: No detectado

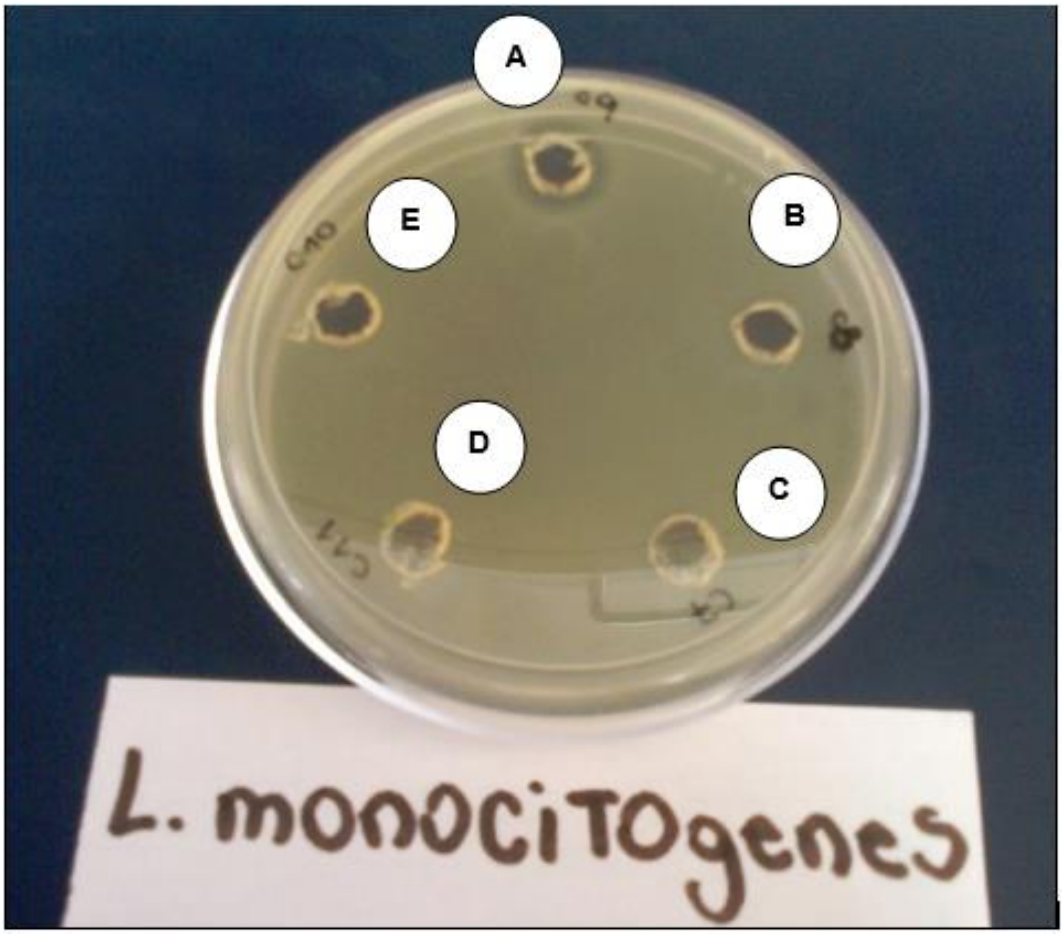


Figura 13. Técnica de Difusión en agar.
Fig. A. Pocillo inoculado con la cepa *Enterococus faecium* MXVK29 muestra el halo de inhibición generado contra *L. monocitogenes*.

Tabla 7. Actividad antimicrobiana en microplacas.

Cepa objetivo*	Crecimiento (DO_{620})								
	Control	R0011	R0052	Lr-32	Lpc-37	Shirota	MXVK29	DSM17918	DSM17938
S. aureus	$1{,}13^{C}$	$1{,}0^{B}$	$1{,}03^{B}$	$1{,}0^{B}$	$1{,}0^{B}$	$0{,}9^{A}$	$1{,}0^{B}$	$1{,}03^{B}$	$1{,}0^{B}$
L. monocytogenes	$1{,}03^{D}$	$1{,}0^{D}$	$1{,}03^{D}$	$0{,}90^{CD}$	$0{,}70^{B}$	$0{,}80^{BC}$	$0{,}70^{B}$	$0{,}80^{BC}$	$0{,}40^{A}$
S. dublin	$1{,}40^{E}$	$1{,}20^{D}$	$1{,}20^{D}$	$1{,}10^{C}$	$0{,}97^{AB}$	$1{,}10^{C}$	$0{,}90^{A}$	$0{,}90^{A}$	$1{,}0^{B}$
E. coli	$1{,}57^{E}$	$1{,}27^{D}$	$1{,}23^{D}$	$1{,}10^{C}$	$1{,}10^{C}$	$1{,}10^{C}$	$0{,}93^{A}$	$1{,}03^{BC}$	$1{,}0^{AB}$

Crecimiento de microorganismos patógenos en su medio óptimo (control) con respecto al crecimiento de los microorganismos patógeno en ELC de cepas probióticas.
*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0{,}05$).

Tabla 8. Características tecnológicas y de seguridad de las bacterias probióticas comerciales.

	L. rhamnosus R0011	*L. helveticus* R0052	*L. rhamnosus* Lr-32	*L. paracasei* Lpc-37	*L. casei* Shirota	*E. faecium* MXVK29	*L. reuteri* DSM17918	*L. reuteri* DSM17938
Generación de biomasa (log_{10} UFC/ml)								
	9,4± 0.08	8,3± 0.10	9,3± 0.13	8,6± 0.07	9,7± 0.10	9,6± 0.10	9,2± 0.10	9,3± 0.08
Crecimiento a (log_{10} UFC/ml)								
7°C	8.9 ± 0.13	sc	8.3 ± 0.10	8.5 ± 0.11	8.8 ± 0.19	9.4 ± 0.36	sc	sc
15°C	9.3 ± 0,18	sc	9 ± 0,10	8.6 ± 0.37	9.6 ± 0.33	9.5 ± 0.31	sc	sc
22°C	9.3 ± 033	7.5 ± 0,32	9.1 ± 0.16	8.6 ± 0.24	9.7 ± 0.10	9.6 ± 0.80	sc	sc
30°C	9.4 ± 0.40	8.3 ± 0,25	9.3 ± 0,35	8.6 ± 0.36	9.7 ± 0.22	9.6 ± 0.13	9.2 ± 0.40	9.3 ± 0.14
37°C	9.4 ± 0.50	8.3 ± 0.30	9.3 ± 0.33	8.6 ± 0.33	9.7 ± 0.50	9.6 ± 0.51	9.2 ± 0.45	9.3 ± 0.07
43°C	9.3 ± 033	7.5 ± 0,32	9.1 ± 0.16	8.6 ± 0.24	9.7 ± 0.10	9.6 ± 0.80	sc	sc
Producción de gas								
	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Producción de ácido (mmol/l) a*								
22 °C	$215{,}94^{A} \pm 0.52$	$28{,}27^{D} \pm 0.39$	$177{,}44^{B} \pm 0.15$	$198{,}29^{A} \pm 0{,}42$	$201{,}52^{A} \pm 0.59$	$147{,}85^{C} \pm 0{,}91$	$7{,}5^{E} \pm 0{,}41$	$7{,}06^{E} \pm 0{,}54$
Crecimiento (OD620) en condiciones simuladas de salame* (24 h a 37°C) 37 C° durante 24 h								
Fermentación	$0{,}57^{D,E} \pm 0.06$	$0{,}77^{B,C,D} \pm 0.06$	$0{,}90^{A,B,C} \pm 0.17$	$0{,}63^{C,D} \pm 0.12$	$0{,}30^{E,F} \pm 0.17$	$0{,}00^{F} \pm 0.00$	$1{,}07^{A,B} \pm 0.04$	$1{,}17^{A} \pm 0.06$
Maduración	$1{,}10^{A,B} \pm 0.17$	$0{,}60^{C,D} \pm 0.10$	$1{,}27^{A,B} \pm 0.12$	$1{,}23^{A,B} \pm 0.23$	$0{,}93^{B,C} \pm 0.15$	$0{,}33^{D} \pm 0.29$	$1{,}33^{A} \pm 0.12$	$1{,}07^{A,B} \pm 0.32$
Actividad catalasa								
	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Producción H_2O_2								
	nd	d	nd	nd	d	nd	d	d
Actividad nitroreductasa								
	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Actividad proteolítica								
	d	nd	d	d	d	d	nd	nd
Actividad lipolítica								
	d	nd	d	d	d	d	nd	nd
Antagonismo contra *S. xylosus*; coco coagulasa negativo (CCN)								
	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Antagonismo contra patógenos								
S. aureus	d	d	d	d	d	d	d	d
L. monocytogenes	nd	nd	d	d	d	d	d	d
S. dublin	d	d	d	d	d	d	d	d
E. coli	d	d	d	d	d	d	d	d

(sc): sin crecimiento; (d): detectado; (nd): no detectado
(*): Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p≤ 0,05).

1
2

IV.10. Selección de cepa BAL probiótica como cultivo iniciador.

La Tabla 9 muestra los resultados de una clasificación de selección de cepas. Allí surgió que las cepas más adecuadas para ser seleccionadas como iniciadoras de salames son *L. rhamnosus* Lr-32, *L. rhamnosus* R0011, *L. paracasei* Lpc-37, *E. faecium* MXVK29 y *L. casei* Shirota. De las cepas mencionadas, la que mejor toleró las condiciones de fermentación y maduración de los embutidos fue *L. rhamnosus* Lr-32.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Rebucci et al (2007) quienes propusieron que las cepas de *L. casei* y *L. rhamnosus* aisladas de salames son los mejores cultivos iniciadores funcionales potenciales en productos cárnicos. En consecuencia, investigaciones recientes han demostrado que cepas de *L. rhamnosus*, *L. fermentum* y *L. paracasei* de origen intestinal humano fueron capaces de sobrevivir al proceso de elaboración de salames, siendo detectadas en gran número en el producto final (Erkkilä *et al*., 2001b; Mati *et al*., 2015; Pidcock *et al*., 2002; Sidira *et al*., 2014).

Considerando que la adaptabilidad y crecimiento de las cepas BAL en las condiciones de fermentación y maduración de los embutidos crudos-curados es un criterio de selección decisivo, se considera que *L. rhamnosus* Lr-32 es la mejor de las cepas estudiadas para ensayar como iniciador en la preparación de tales salames. Un cultivo iniciador probiótico adaptado a la ecología de la fermentación de la carne, con esas propiedades potenciales y actividad antimicrobiana, podría proporcionar importantes beneficios para la salud y contribuir a mejorar la calidad higiénica de los productos (Papamanoli *et al*., 2003). Resaltamos que la cepa *L. rhamnosus* Lr-32 es de interés para posteriores ensayos en embutidos de acuerdo a los resultados obtenidos. Aunque la cepa tuvo excelentes resultados *in vitro*, su desempeño como iniciador en salames dependerá de su capacidad para sobrevivir y cumplir sus funciones dependiendo de las materias primas, las condiciones de preparación de los salames y las comunidades de microbiota autóctonas existentes.

Tabla 9. Criterios de selección de cepas según los resultados obtenidos.

	L. rhamnosus Lr-32	*L. rhamnosus* R0011	*L. paracasei* Lpc-37	*E. faecium* MXVK29	*L. casei* Shirota	*L. reuteri* DSM17918	*L. reuteri* DSM17938	*L. helveticus* R0052
Generación de biomasa	1	1	1	1	1	1	1	1
Crecimiento en todas las diferentes temperaturas testeadas	1	1	1	1	1	0	0	0
No producción de gas	1	1	1	1	1	1	1	1
Producción de ácido	1	1	1	1	1	0	0	0
Crecimiento en condiciones de fermentación	1	0	0	0	0	1	1	0
Crecimiento en condiciones de maduración	1	1	1	0	0	1	1	0
Actividad catalasa	0	0	0	0	0	0	0	0
No producción de H_2O_2	1	1	1	1	0	0	0	0
Actividad nitroreductasa	0	0	0	0	0	0	0	0
Actividad proteolítica	1	1	1	1	1	0	0	0
Actividad lipolítica	1	1	1	1	1	0	0	0
Antagonismo contra *S. xylosus*	1	1	1	1	1	1	1	1
Antagonismo contra todos los patógenos probados	1	0	1	1	1	1	1	0
No descarboxilación de aminoácidos	1	1	1	0	0	0	0	0
Número total de resultados de reacciones positivas	12	10	11	10	8	6	6	3

(0): resultado negativo para la reacción deseada; (1): resultado positivo para la reacción deseada.

IV.11. Enumeración selectiva de *L. rhamnosus* Lr-32.

Los resultados de la enumeración selectiva de *L. rhamnosus* Lr-32 se presentan en la Tabla 10. El agar MRS a 30°C fue óptimo para el crecimiento de todos los inóculos puros de las cepas de BAL y homogenatos. En las placas de agar MRS a 43°C solo se evidenció crecimiento de *L. rhamnosus* Lr-32, *E. faecium* MXVK29 y homogenato comercial inoculado con *L. rhamnosus* Lr-32. No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) en los recuentos de *L. rhamnosus* Lr-32 obtenidos a 30 y 43°C (Tabla 11). Con excepción de la cepa *E. faecium* MXVK29 el agar MRS-V a 30°C fue adecuado para el crecimiento de todos los inóculos de BAL puros y homogenatos. Este resultado demostró el efecto inhibitorio de la vancomicina sobre el enterococo. En las placas sembradas con MRS-V a 43°C solo se evidenció crecimiento del inóculo puro de L. *rhamnosus* Lr-

32 y en el homogenato comercial inoculado con *L. rhamnosus* Lr-32. No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) en los recuentos de *L. rhamnosus* Lr-32 en agar MRS-V a 30 y 43°C (Tabla 11). En el homogenato de salame comercial inoculado con *L. rhamnosus* Lr-32 sembrado en agar MRS-V a 43°C tanto en aerobiosis como en anaerobios se observó el crecimiento de un solo tipo de colonia, muy característica, de gran tamaño, color blanco, de aspecto cremoso y bordes irregulares. Esta morfología es similar a la observada en las colonias crecidas en las mismas condiciones a partir del cultivo puro de *L. rhamnosus* Lr-32 (Fig. 14). Las condiciones de anaerobiosis además de hacer que el medio de cultivo sea más selectivo, permitió un mejor desarrollo de las colonias, donde estas se observaron de mayor tamaño y con características macroscópicas más diferenciadas que en condiciones de aerobiosis. De las colonias crecidas en agar MRS-V a 43°C en anaerobiosis se seleccionaron colonias que fueron estudiadas. Todas las cepas resultaron Gram +, catalasa - y de forma de bacilo en la observación microscópica.

A partir de los ensayos realizados se observó que el factor limitante más importante para el aislamiento selectivo de *L. rhamnosus* Lr-32 es la temperatura de incubación de los cultivos. Esto evidencia el efecto de inhibición de la temperatura sobre el crecimiento de las cepas presentes en salames comerciales y el iniciador PCFF-1. *L. rhamnosus* no es una BAL aislada frecuentemente en salames fermentados con microbiota nativa (Tharmaraj and Shah, 2003) lo que hace suponer que estará presente solo cuando sea utilizada como iniciador. Tal como lo describe Tharmaraj y Shah (2003) el medio de cultivo agar MRS-V a 43°C en condiciones de anaerobiosis durante 72 h resulto efectivo para el crecimiento y aislamiento selectivo de *L. rhamnosus* Lr-32 y puede ser utilizado para separar esta cepa en un producto cuando se encuentre en presencia de varios tipos de microorganismos similares.

Tabla 10. Crecimiento de cepas en medio de cultivo selectivo (MRSV 43°C).

Características	*L. rhamnosus* Lr-32	*E. faecium* MXVK29	*P. pentosaceus* PCFF-1	*L. plantarum* Lp-UCC	*L. sakei* Ls-UCC	Salame comercial	Salame comercial + *L. rhamnosus* Lr-32
Crecimiento en MRS a 30°C:	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en MRS a 43°C:	+	+	-	-	-	-	+
Crecimiento en MRS-V a 30°C:	+	-	+	+	+	+	+
Crecimiento en MRS-V a 43°C:	+	-	-	-	-	-	+

(+): crecimiento
(-): sin crecimiento

Tabla 11. Crecimiento de L. rhamnosus Lr-32 en medio de cultivo selectivo (MRSV 43°C).

Características	*L. rhamnosus* Lr-32 (log_{10} UFC/ml)
Crecimiento en MRS a 30°C*:	$8,62^{A}$
Crecimiento en MRS-V a 30°C*:	$8,60^{A}$
Crecimiento en MRS a 43°C*:	$8,63^{A}$
Crecimiento en MRS-V a 43°C*:	$8,64^{A}$

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Figura 14. Morfología de colonias de L. rhamnosus Lr-32.
Incubación en anaerobiosis en medio de cultivo selectivo MRSV.

IV.12. Determinaciones fisicoquímicas.

IV.12.1. Medición de pH.

Los lotes iniciaron en valores próximos de pH 6, luego este descendió durante los dos días de fermentación hasta alcanzar un pH cercano a 5 y finalmente, comenzó a subir hasta llegar a valores cercanos de pH 5,6 después de 11 días de maduración y secado (Fig. 15). Los valores finales de pH obtenidos en este trabajo de investigación estuvieron de acuerdo con los hallazgos de otros estudios sobre embutidos fermentados de baja acidez (Sirini *et al*., 2022a). El lote II elaborado con el iniciador comercial Bactoferm F1-100 es el que muestra el mayor descenso de pH, alcanzando al final del período de fermentación y secado un valor de pH= 5,45. El resto de los lotes alcanzaron un pH final de: lote I pH= 5,57 y lote

III pH= 5,60. Existen diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) en el valor final de pH entre el lote II y III (Tabla 12).

Los valores obtenidos de pH durante el ensayo se corresponden a embutidos crudo-curados de baja fermentación. Los productos cárnicos fermentados de baja acidez (pH final, 5,3 a 6,2) son un grupo de productos mediterráneos tradicionales (Aymerich *et al*., 2003; Sirini *et al*., 2022a). Los valores más bajos de pH se presentaron en los salames del lote II fermentados con el iniciador comercial *P. pentosaceus* PCFF-1. Se ha observado una reducción de los valores de pH en la fermentación de salames causada por la acumulación de ácido láctico de las BAL que metabolizan los carbohidratos (glucosa y sacarosa) (Campagnol *et al*., 2011). Estos resultados coinciden con los obtenidos en ensayos preliminares (Agüero *et al*., 2020) donde dicha cepa produjo mayor cantidad de ácido láctico que el probiótico *L. rhamnosus* Lr-32 inoculado en el lote III. Los valores de pH más bajos en las muestras de tipo II coinciden con el mayor número de BAL en comparación con el producto tipo I y III. En la fabricación del producto de tipo II se observó la caída de pH más rápida mientras que los lotes de tipo I y III mostraron una caída más lenta debido a la diferente evolución de las BAL en los tres tipos de productos. Al día cero, los recuentos de BAL en los tres lotes de productos fueron los más bajos. Al segundo día del proceso la población de BAL presentó un incremento importante, correlacionado con una disminución sustancial en los valores de pH. Al final del proceso de fermentación, el mayor recuento de BAL en los lotes de tipo II (10,16 $\log_{10}$ UFC/g) corresponde al valor de pH más bajo observado (5,03) de todos los lotes. Las BAL dominaron la microbiota durante la fermentación y maduración como ocurre en otros embutidos fermentados (Papamanoli *et al*., 2003; Pavli *et al*., 2020). El aumento de la población de BAL que crecen durante la fermentación provoca la reducción del pH, esto coincide con lo encontrado por Fontana *et al*. (2005), al estudiar la etapa de maduración en embutidos artesanales argentinos. Este descenso inicial del pH normalmente es justificado por el desarrollo de BAL homofermentativas en embutidos crudo-curados (Ordoñez *et al*., 1999). Al final del proceso de producción se observó un aumento de los valores de pH en todos los tratamientos. El aumento del pH hacia el final se debe a la proteólisis de la matriz cárnica y al aumento de componentes básicos, generando péptidos, aminoácidos, y aminas que tienen un efecto buffer sobre los ácidos orgánicos producidos por el ácido láctico bacteriano durante la fermentación

(Cenci-Goga *et al*., 2012; Ruiz-Moyano *et al*., 2011). Otros estudios han informado que dicho aumento del pH se puede atribuir a la producción de amoníaco debido a la actividad enzimática durante la maduración (proteólisis), un aumento de las sustancias buffers y una disminución de los electrolitos (Campagnol *et al*., 2011; Sirini *et al*., 2022a).

Pavli *et al*. (2020) estudiaron el efecto de la cepa *Lactiplantibacillus plantarum* L125 con potencial probiótico sobre las características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales de embutidos secos fermentados. Los autores descubrieron que la adición de *Lactiplantibacillus plantarum* L125 no tenía ningún efecto sobre el pH de los salames.

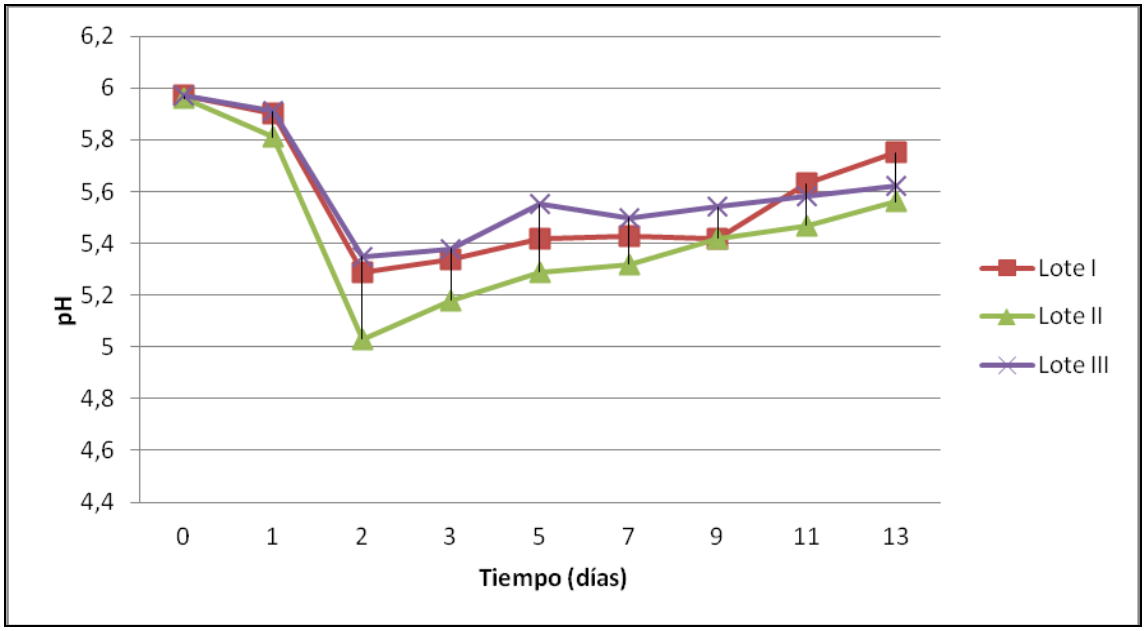


Figura 15. Valor de pH durante fermentación (D0, D1, D2) y secado/maduración (D3, D5, D7, D9, D11, D13).

Tabla 12. Medición de pH.

Lote	pH_{D0}	pH_{D1}	pH_{D2}	pH_{D3}	pH_{D5}	pH_{D7}	pH_{D9}	pH_{D11}	pH_{D13}
Lote I*	$5,97^{A}$	$5,9^{A}$	$5,29^{B}$	$5,34^{B}$	$5,42^{AB}$	$5,43^{AB}$	$5,42^{A}$	$5,63^{A}$	$5,57^{AB}$
Lote II*	$5,96^{A}$	$5,81^{A}$	$5,03^{A}$	$5,18^{A}$	$5,29^{A}$	$5,32^{A}$	$5,42^{A}$	$5,47^{A}$	$5,45^{A}$
Lote III*	$5,97^{A}$	$5,91^{A}$	$5,35^{B}$	$5,38^{B}$	$5,55^{B}$	$5,5^{B}$	$5,54^{A}$	$5,58^{A}$	$5,60^{B}$

Comparación de pH entre lotes medidos en diferentes días (DO, D1, D2, D3, D5, D7, D9, D11, D13).

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

IV.12.2. Medición pérdida de peso.

La pérdida de peso al final del período de secado/maduración (13 días) (Fig. 16) expresada como % de merma (ME) fue del lote I= 31%, lote II= 34% y lote III= 33% (Fig. 15). Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre la ME del lote I con respecto a la ME del lote II y III (Tabla 13).

Durante la producción, los salames pierden peso debido al proceso de deshidratación. En este estudio, observamos una pérdida de peso, que varió entre 31- 34%. Estos valores, son reportados como adecuados, ya que se considera el rango de 30 a 40% como ideal para salames (Campagnol *et al*., 2011). El lote que presento la mayor ME inicial y que se mantuvo hasta el final del ensayo fue el lote II, obteniendo una ME del 34%. Esta pérdida se corresponde con el menor valor de pH obtenido durante el tratamiento y su asociación con la proteólisis y la liberación de agua. Se puede asociar la pérdida de peso con los bajos niveles de pH encontrados en los embutidos crudo-curados y la disminución de la capacidad de retención de agua de la matriz proteica (Sayas-Barberá *et al*., 2012).

Los lotes con menor ME fueron el lote I y lote III, que obtuvieron valores de pH más altos que el lote II. Esto fue también observado por Tabanelli (2012) al estudiar distintos cultivos iniciadores frente a un control en salame tipo Felino Italiano.

En un estudio realizado por Cavalheiro *et al*. (2021) se añadió *E. faecium* CECT 410 utilizando células libres y células inmovilizadas en alginato de sodio.

Esto dio como resultado una disminución en el pH y la actividad de agua del salame, en contraste con el grupo de control, en el transcurso de un período de fermentación de 20 días.

El pH de los salames elaborados, es el típico de salames mediterráneos de baja acidez (pH>5,3) (Sayas-Barberá *et al*., 2012). En este tipo de productos de baja acidez, la a_W es uno de los factores que previene fuertemente el deterioro bacteriano, la estabilidad de los productos finales y asegura su vida útil (Sayas-Barberá *et al*., 2012).

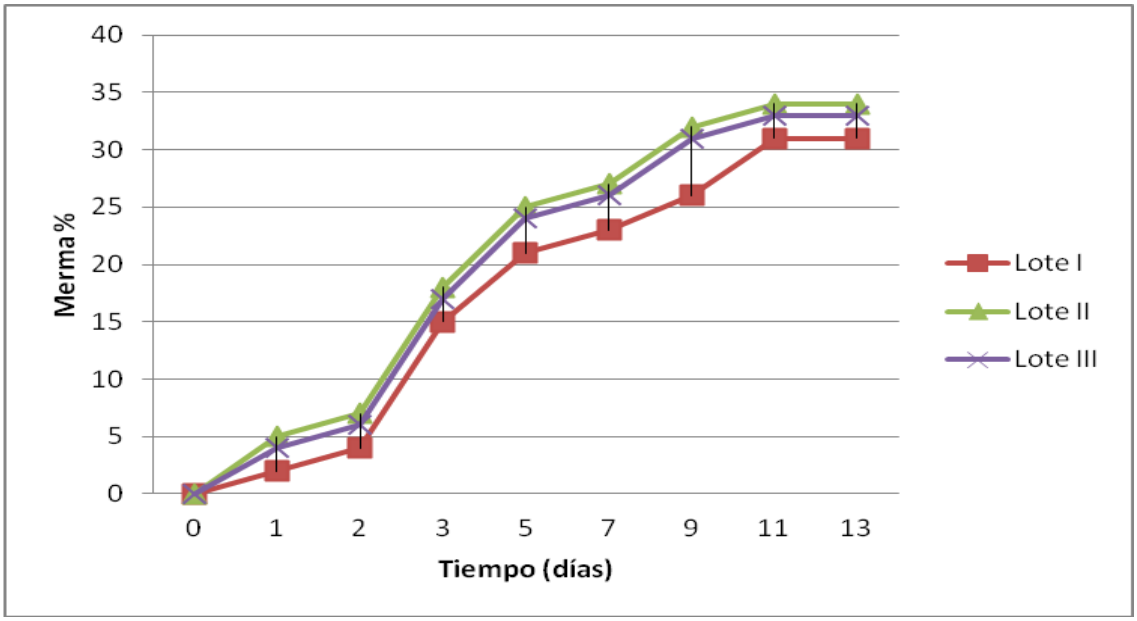


Figura 16. Curva de pérdida de peso durante fermentación (D0, D1, D2) y secado/maduración (D3, D5, D7, D9, D11, D13).

Tabla 13. Medición de pérdida de peso (ME %).

Lote	ME_{D1} (%)	ME_{D2} (%)	ME_{D3} (%)	ME_{D5} (%)	ME_{D7} (%)	ME_{D9} (%)	ME_{D11} (%)	ME_{D13} (%)
Lote I*	2^A	4^A	15^A	21^A	23^A	26^A	31^A	31^A
Lote II*	5^B	7^B	18^B	25^B	27^B	32^B	34^B	34^B
Lote III*	4^B	6^B	17^B	24^B	26^B	31^B	33^B	33^B

Comparación de pérdida de peso entre lotes medidos en diferentes días (D1, D2, D3, D5, D7, D9, D11, D13).

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

IV.12.3. Medición objetiva del color.

Se reportaron valores más altos de Luminosidad (L*) a las 48 h de procesado, según Sirini *et al*. (2023), la generación de ácido láctico durante el proceso de fermentación podría resultar en un aumento de (L*). Posteriormente este valor disminuye durante la etapa de madurado y hacia el final del ensayo (Fig. 17). Esto también fue observado por Beriain *et al*. (2011) y Campagnol *et al*. (2011). Se encuentran diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en las mediciones de L_{D14} y L_{D21} donde el lote II presenta mayor luminosidad (Tabla 14). Con respecto a los valores de la coordenada a*, se observó un aumento en el enrojecimiento en la coordenada en todos los lotes a lo largo del tiempo (Fig. 18). En cuanto a la coordenada b*, se reportaron valores en todos los lotes más altos al inicio, luego a las 48 h de procesado se reportan valores más bajos que se mantienen así durante la etapa de madurado/secado y conservación (Fig. 19) No existen diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los lotes para las coordenadas a* y b* (Tabla 14).

Alvarez (1996) ha estudiado el comportamiento del curado en seco en embutidos curados en seco. Este autor menciona que la Luminosidad (L*) disminuye por la deshidratación mientras que a* (coordenada de color rojo-verde) aumentó. Este aumento es causado por la formación de pigmentos hemo nitrosados (principalmente nitrosomioglobina) y concentración de pigmentos mediante un proceso de deshidratación. La coordenada de color amarillo-azul (b*) disminuyó debido a la interconversión de los pigmentos de la carne.

Luminosidad (L*): Los valores L* de los productos cárnicos están relacionados principalmente con la humedad (Fernández-López *et al*., 2008). El fenómeno de variación de L* se debe por un lado a la deshidratación parcial del producto durante el proceso de fermentación, y por el otro por la fijación del color característico del producto, debido a la acción de *Micrococcus* sobre los nitratos y nitritos de la formulación (Olivares *et al*., 2010; Sayas-Barberá *et al*., 2012). Además, Pérez-Alvarez y Fernández-López (2012) mencionaron que L* puede verse influenciado por movimientos “libres de agua” en la superficie del producto cárnico. Así, L* es menor debido a una disminución en el contenido de humedad,

menos agua libre en la superficie del salame y concentración de pigmentos. El lote II tiene mayor luminosidad y es el que menor valor de pH y mayor ME presenta.

En las mediciones de L_{D14} y L_{D21} donde el lote II presenta mayor luminosidad (Fig. 17), el efecto estaría dado en ambos tiempos por el agregado del cultivo iniciador comercial, el cual produce mayor cantidad de ácido láctico. Esto ocasiona una mayor acidificación, un menor pH y el comportamiento de las proteínas liberando agua, menor capacidad de retención de agua (CRA), a través de la desnaturalización que ejerció el ácido sobre la matriz proteica (Zogbi, 2005). Esta etapa se caracteriza por presentar agua en superficie, lo que aumenta la luminosidad.

Coordenada a*: El enrojecimiento (a*) se utiliza como indicador de la estabilidad del color en la carne y los productos cárnicos (Sirini *et al*., 2022a). Con respecto a los valores de a* en este ensayo, se observó un aumento en el enrojecimiento en la coordenada a* (Fig. 18) debido a la formación de nitrosomioglobina y también a la pérdida de humedad, lo que provoca un aumento en la concentración del hemopigmento (Sayas-Barberá *et al*., 2012; Sirini *et al*., 2022a), seguido por una estabilización durante la maduración y almacenamiento, coincidente con lo encontrado por Olivares *et al*. (2010).

Coordenada b*: Se reportaron valores más altos al inicio, luego a las 48 h de procesado se reportan valores más bajos que se mantienen así durante la etapa de madurado y conservación (Fig. 19), estos resultados coinciden con los encontrados por Sayas-Barberá *et al*. (2012). La disminución del amarillo de los embutidos crudo-curados se ha atribuido a las modificaciones en los estadios de mioglobina, en particular a la reducción de la oximioglobina (Sayas-Barberá *et al*., 2012). Por otro lado, la incorporación de sal puede interferir en la formación de oximioglobina y podría por lo tanto ser responsable de la disminución de esta coordenada. La sal sería responsable de la disminución de la solubilidad del oxígeno en el agua y por lo tanto dificultaría la oxigenación de la mioglobina que esta liberada durante el proceso de picado (Fernández-López, 1998).

Tabla 14. Parámetros de color de salames.

Coordenada	Lote	D0	D2	D7	D14	D21	D28	D35	D49	D63	D77	D95
L*	Lote I*	44,52^{A}	45,29^{A}	43,94^{A}	42,07^{A}	41,29^{A}	44,52^{A}	40,59^{A}	45,82^{A}	41,58^{A}	40,35^{A}	38,59^{A}
	Lote II*	45,84^{A}	45,92^{A}	44,43^{A}	46,28^{C}	46,52^{B}	45,84^{A}	40,47^{A}	40,05^{A}	42,1^{A}	40,35^{A}	38,05^{A}
	Lote III*	44,83^{A}	45,01^{A}	42,83^{A}	43,82^{B}	42,83^{A}	44,83^{A}	40,92^{A}	41,4^{A}	40,58^{A}	40,15^{A}	38,14^{A}
a*	Lote I*	4,74^{A}	7,95^{A}	8,75^{A}	8,95^{A}	8,87^{A}	9,95^{A}	11,26^{A}	8,94^{A}	10,99^{A}	10,32^{A}	11,58^{A}
	Lote II*	3,79^{A}	7,8^{A}	8,78^{A}	9,77^{A}	9,5^{A}	9,8^{A}	11,29^{A}	10,77^{A}	10^{A}	10,48^{A}	11,03^{A}
	Lote III*	4,57^{A}	7,98^{A}	8,28^{A}	9,68^{A}	9,77^{A}	9,98^{A}	11,05^{A}	10,71^{A}	11,42^{A}	11,4^{A}	11,19^{A}
b*	Lote I*	10,97^{A}	8,06^{A}	8,01^{A}	7,46^{A}	7,53^{A}	7,86^{A}	7,63^{A}	7,44^{A}	7,76^{A}	7,8^{A}	8,55^{A}
	Lote II*	10.31^{A}	8,41^{A}	7,98^{A}	7,29^{A}	7,42^{A}	7,49^{A}	7,72^{A}	7,84^{A}	7,57^{A}	8,01^{A}	8,71^{A}
	Lote III*	10,83^{A}	8,75^{A}	7,67^{A}	7,57^{A}	7,57^{A}	7,77^{A}	7,97^{A}	7,62^{A}	7,95^{A}	8,11^{A}	8,91^{A}

Medición de coordenadas L*, a*, b* en diferentes días (D0, D2, D7, D14, D21, D28, D35, D49, D63, D77, D95).

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p≤ 0,05).

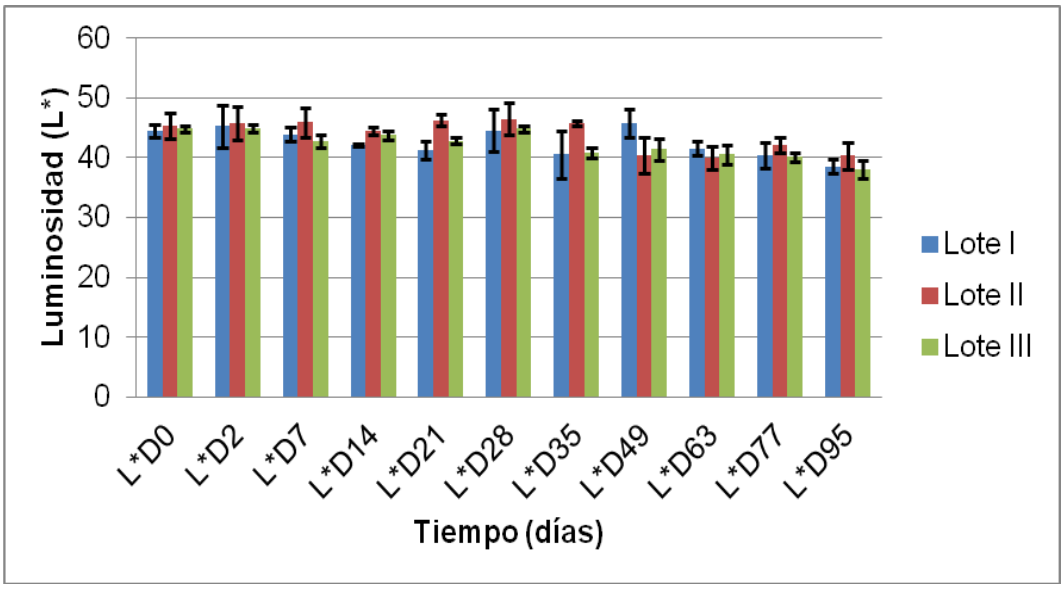


Figura 17. Luminosidad (L*).

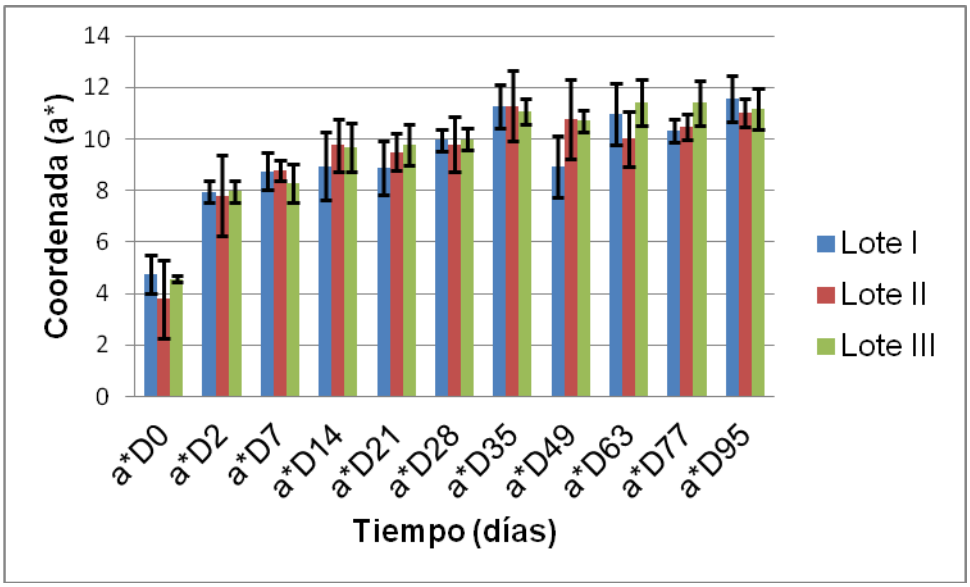


Figura 18. Coordenada a*.

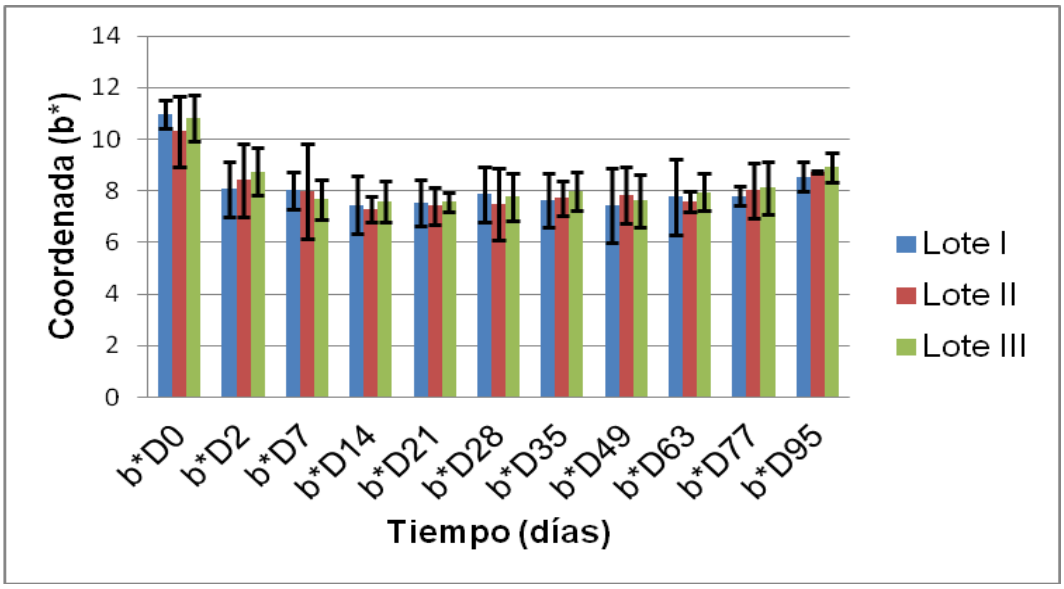


Figura 19. Coordenada b*.

IV.13. Determinaciones microbiológicas.

El número de BAL creció en los salames durante el período de fermentación como era esperado. Estas disminuyeron durante la etapa de maduración y conservación, pero los 3 lotes alcanzaron más de 7 $\log_{10}$ UFC/g al día 95 (Fig. 20). Hubo diferencias estadísticas significativas entre el número de BAL de los 3 lotes ($p \leq 0,05$) al día 0 (debido a la utilización de cultivos iniciadores en el lote II y III) y desde el día 21 al día 95 donde los recuentos fueron mayores en el lote I y II, posiblemente debido a la mayor adaptación de las cepas a la matriz cárnica. No hubo diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$) durante la etapa de fermentación (Tabla 15). El número de micrococos creció durante la etapa de fermentación y secado/maduración (día 7) y luego fue disminuyendo a partir del día 14 hacia el final de la etapa de conservación, los 3 lotes alcanzaron aproximadamente 6 $\log_{10}$ UFC/g al día 95. (Fig. 20). Hubo diferencias estadísticas significativas en el recuento de *Staphylococcus* de los 3 lotes ($p \leq 0,05$) al día 0 (debido a la utilización de cultivos iniciadores en el lote II y III) y desde el día 7 al día 49 donde los recuentos fueron mayores en el lote I y II, no hubo diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$) desde el día 63 hasta el final del ensayo (día 95) (Tabla 15). El número de enterobacterias disminuyó durante la etapa de fermentación y maduración, detectándose ausencia al día 14 en los tres lotes (Fig. 22). Hubo diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$) entre el lote III y los lotes I y II (Tabla 15), los recuentos fueron menores en el lote elaborado con el microorganismo probiótico *L. rhamnosus* Lr-32.

Las BAL se caracterizaron como el grupo poblacional dominante después de la fermentación-maduración y durante el período de almacenamiento tanto en el caso de los lotes controles como en el lote elaborado con la cepa *L. rhamnosus* Lr-32 como ocurre en otros fermentados (Milićević *et al*., 2021; Pavli *et al*., 2020). Las BAL se desarrollaron rápidamente. El rápido crecimiento de las BAL es muy importante para la seguridad y la calidad de los salames porque el crecimiento temprano de estas bacterias puede prevenir el crecimiento de bacterias patógenas y deteriorantes (Campagnol *et al*., 2011).

Debido a la inoculación, los recuentos de BAL fueron mayores al inicio (día 0) en el lote III inoculado con el probiótico *L. rhamnosus* Lr-32, comenzando con una población de 7,33 log_{10} UFC/g y en el lote II inoculado con la cepa *P. pentosaceus* PCFF-1 con un recuento de 6,33 log_{10} UFC/g, mientras que en el lote I, sin inóculo, la población fue de 5,23 log_{10} UFC/g, evidenciando la influencia directa del agregado del iniciador, lo mismo fue encontrado por otros autores (Drosinos *et al*., 2005). Esto también fue observado por Lu *et al.* (2010) al estudiar embutidos control frente a aquellos con cultivo iniciador. Milićević *et al*., (2021) encontró que en los salames preparados sin cultivos iniciadores, el número de BAL iniciales fue de aproximadamente 5 log UFC/g.

Durante la etapa de fermentación los recuentos se elevaron siendo los valores al final del período (día 2) de 9,86 log_{10} UFC/g para el lote III, 10,16 log_{10} UFC/g para el lote II y 9,99 log_{10} UFC/g para el lote I. El rápido aumento de las BAL durante los primeros días de fermentación está de acuerdo con los resultados encontrados por Milićević *et al*., (2021) en salames elaborados con y sin cultivo iniciador. Durante el período de maduración y conservación, estos valores comenzaron a descender llegando al día 95 con recuentos de 7,70 log_{10} UFC/g lote III, 8,30 log_{10} UFC/g lote II y 8,15 log_{10} UFC/g para el lote I. Los valores se encontraron en general en un rango de 7 a 8 Log_{10} UFC/g., esto también fue descripto por Drosinos *et al*. (2005) y Erkkilä *et al*. (2001a). El mayor recuento de BAL en el lote I fermentado por microbiota natural y lote II fermentado por un iniciador comercial, se debe a que estas cepas están adaptadas a la matriz cárnica, mientras que *L. rhamnosus* Lr-32 es un iniciador experimental. Lo novedoso del ensayo, es que *L. rhamnosus* Lr-32 mantiene durante un largo período de tiempo (95 días) recuentos tan altos, que son necesarios en un alimento, como un primer requisito, para que un probiótico pueda ejercer su función al ser consumido. Hoy en día, los cultivos iniciadores desempeñan un papel muy importante más allá de la calidad en los salames, al proporcionar beneficios adicionales para la salud. Esta condición es particularmente relevante en el caso de los microorganismos probióticos (Sirini et al., 2022b).

La cepa de probióticos debe estar viva y abundante una vez ingerida. Por tanto, el uso de cepas probióticas adecuadas en dosis adecuadas es un requisito importante. Muchas características son específicas de la cepa y estarán estrechamente relacionadas con la dosis necesaria. La capacidad de la cepa para

sobrevivir al paso por el ambiente ácido del estómago y la capacidad de adherirse al epitelio del intestino o a la capa mucosa influirán en la permanencia y multiplicación de las bacterias probióticas en el intestino. La mayor parte de la evidencia científica muestra que las dosis mínimas a partir de las cuales se observan efectos beneficiosos se sitúan entre 10^6-10^9 células vivas al día (Champagne *et al*., 2011; Hill *et al*., 2014; Sirini *et al*., 2021).

En este estudio las BAL alcanzaron valores de 8 Log_{10} UFC/g, similar a lo encontrado por otros autores (Campagnol *et al*., 2011; Cocolin *et al*., 2009; Drosinos *et al*., 2005; Erkkilä *et al*., 2001b; Ruiz-Moyano *et al*., 2011; Tabanelli *et al*., 2012).

En estudios realizados por Pavli *et al*., (2020) utilizando *Lactiplantibacillus plantarum* L125, las BAL se caracterizaron como el grupo de población dominante durante la etapa de fermentación, maduración y almacenamiento. Las BAL aumentaron durante la etapa de fermentación, se mantuvieron estables durante la maduración y luego disminuyeron significativamente al final del período de almacenamiento.

El crecimiento exponencial es normalmente asociado con la producción de ácido láctico y el índice de pH en embutidos fermentados, especialmente cuando se utilizan cultivos iniciadores como *P. pentosaceus*, en relación inversa a los embutidos sin iniciador (Aro Aro *et al*., 2010). Esta función también se ve incrementada cuando existen mayores niveles de carbohidratos disponibles. Los *Pediococcus* son normalmente aislados en embutidos artesanales argentinos (Fontana *et al*., 2005).

Por su parte el *L. sakei* y el *S. xylosus* se aíslan de la mayoría de los embutidos fermentados, tanto tipo Fuet como tipo chorizo (Aymerich *et al*., 2003).

En el caso de embutidos artesanales argentinos, se aíslan frecuentemente, en orden de prevalencia: *L. sakei, L, plantarum y L. curvatus* (Fontana *et al*., 2005).

El incremento en el uso masivo de cultivos industriales puede traer aparejado la desaparición o disminución de la diversidad microbiológica de distintos nichos, conservadas hoy en pequeñas plantas elaboradoras de escala artesanal (Fontana *et al*., 2005).

Radulović *et al*. (2011) en embutidos fermentados con agregado de cepas probióticas, con el mismo cultivo iniciador (F1-100, Hansen®) encontraron conteos de *P. pentosaceus* de 6 Log_{10} UFC/g al inicio, aumentando a 8 Log_{10} UFC/g a los

siete días, con un leve descenso hacia el final de la prueba, similar a lo encontrado en este ensayo. Normalmente las BAL se encuentran en niveles de 2 Log_{10} UFC/g en las materias primas, dominando rápidamente la fermentación posterior, soportando niveles de NaCl, nitrato/nitrito y un ambiente anaerobio (Vignolo *et al*., 2010).

Un comportamiento similar se evidenció para los micrococos que comenzaron con recuentos de 6,61 log_{10} UFC/g lote III, 6,23 log_{10} UFC/g lote II y 4,79 log_{10} UFC/g lote I, los valores para el lote I (sin iniciador) fueron similares a los encontrado por Fontana *et al*. (2005), en embutidos artesanales argentinos. Milićević *et al*., (2021) encontró que en los salames preparados sin cultivos iniciadores, el número de CNC iniciales fue de aproximadamente 4 log UFC/g.

Alcanzaron luego del periodo de fermentación (día 2) valores de 8,33 log_{10} UFC/g lote III, 8,40 log_{10} UFC/g lote II y 8,36 log_{10} UFC/g lote I. A partir del día 14, durante el período de maduración y conservación, estos valores comenzaron a descender llegando al día 95 con recuentos de 5,67 log_{10} UFC/g lote III, 5,82 log_{10} UFC/g lote II y 5,72 log_{10} UFC/g para el lote I (Fig. 21), similar a lo encontrado por Milićević et al., (2021), Corral *et al*. (2013) y Hospital *et al*. (2012), estando descripto en la literatura por la disminución del pH y la concentración de oxígeno durante la maduración (Campagnol *et al*., 2011; Milićević *et al*., 2021).

En estudios realizados por Pavli *et al*., (2020) los Estafilococos, disminuyeron al final de la maduración alcanzando niveles promedio de 5,57 y 4,44 log UFC/g. Los bajos valores de pH debido a la alta capacidad acidificante de la microbiota endógena de BAL da como resultado la reducción de los micrococos (Pavli *et al*., 2020). Como en el caso de las BAL, los embutidos sin cultivo iniciador presentan crecimiento espontáneo de CCN en salames (Fernández-López *et al*., 2008).

Algunos autores describen que los CCN y *Staphylococcus* crecen en orden de los 2 Log_{10} UFC/g durante los primeros siete días de estufado-maduración (Campagnol *et al*., 2012), seguido de un proceso de disminución.

Normalmente los valores de CCN son mayores en los embutidos con cultivo iniciador (Cenci-Goga *et al*., 2012). Los CCN aislados frecuentemente en embutidos crudo-curados argentinos, están representados por un amplio espectro de cepas (*S. sciuri, S. equorum, S. epidermidis, S. pulvereri* y *S. saprophyticus*), que con el tiempo son dominadas por el *S. saprophyticus* (Fontana *et al*., 2005).

Por su parte Vignolo *et al*. (2010), de los CCN los más frecuentemente encontrados figuran el *S. xylosus* y *el S. carnosus* en embutidos tradicionales. En otros embutidos crudo-curados Belgas es frecuente aislar *S. carnosus* (Janssens *et al*., 2012), ya sea por generación espontánea, o como competidor al ser agregado como cultivo iniciador. Ravyts *et al*. (2010) por su parte encontraron más frecuentemente *S. xylosus* en embutidos con y sin cultivo iniciador, indicando una excelente adaptación al medio cárnico.

Papamanoli *et al.* (2002) observaron interesantes propiedades tecnológicas de cepas de *S. xylosus* en embutidos típicos griegos, con un correcto índice de nitrosación, baja demanda de oxígeno, resistencia a distintos niveles de sodio, y un potencial efecto antagonista frente a *Listeria monocytogenes*.

Radulović *et al*. (2011) en un estudio de embutidos fermentados con agregado de cepas probióticas, con el mismo cultivo iniciador (F1- 100, Hansen®) encontró recuentos de *S. xylosus* de 6 Log_{10} UFC/g al inicio, valor que se mantuvo durante la prueba.

Por su parte Erkkilä *et al*. (2001a) describe que el número de *Staphylococcus* es de 6 Log_{10} UFC/g luego de la inoculación y se mantiene a ese nivel hasta el final del período de maduración (28 días).

Janssens *et al*. (2012) encontraron niveles iniciales de enterobacterias de 2,8 log_{10} UFC/g, que en general son rápidamente eliminados durante el proceso de fermentación. El número de enterobacterias disminuyó durante el período de fermentación de 3,61 log_{10} UFC/g a 2,74 log_{10} UFC/g en el lote III, de 3,60 log_{10} UFC/g a 3,25 log_{10} UFC/g para el lote II y de 3,58 log_{10} UFC/g a 3,31 log_{10} UFC/g para el lote I. Los bajos recuentos de enterobacterias (Fig. 22) se correlacionan con los bajos valores de pH del producto fermentado. Si bien el número de BAL fue el más alto en el lote I y II quienes tuvieron a su vez el valor de pH más bajo, el menor recuento de enterobacterias se observó en el lote tipo III. Estos resultados pueden relacionarse con las pruebas de antagonismo realizadas *in vitro* (Agüero *et al*., 2020) donde *L. rhamnosus* Lr-32 produce sustancias que inhiben el crecimiento de enterobacterias tales como *E. coli* y Salmonella. Se determinó ausencia de enterobacterias al día 14 en los 3 lotes, este resultado también fue observado por Campagnol *et al*. (2011).

En estudios realizados por Chen *et al*., (2021) utilizando la combinación de *Staphylococcus xylosus* SX16 y *Lactiplantibacillus plantarum* CMRC6 reveló que la

adición de estas cepas, aceleró la acidificación y la proteólisis durante la maduración, y también suprimió el crecimiento de *Enterobacteriaceae* en los salames inoculados.

Pavli *et al*., (Pavli *et al*., 2020) encontraron niveles de bacterias de descomposición como *Pseudomonas* spp., *Brochothrix* spp., Enterobacteriaceae y levaduras/mohos, así como *Listeria monocytogenes* por debajo del límite de detección del método de enumeración (<2 log UFC/g) durante todo el período de fermentación, maduración y almacenamiento.

Varios estudios han demostrado que las cepas de BAL fueron capaces de reducir el crecimiento de bacterias patógenas como Salmonella enterica y listeria presentes en la matriz cárnica. Por lo tanto, las bacterias probióticas también proporcionan una mayor seguridad y estabilidad del producto (Mainar *et al*., 2017; Sirini *et al*., 2021; Slima *et al*., 2018).

Brusa *et al*. (2021) han descubierto que el riesgo de contraer listeriosis por el consumo de salames fermentados se redujo al menos en tres órdenes de magnitud mediante el uso de iniciadores de BAL.

En estudios realizados por Stegmayer *et al.* (2023) el uso de cultivos iniciadores en salames redujo significativamente el pH, la humedad, la a_w, el recuento de enterobacterias y el recuento de levaduras y mohos. Los resultados sugieren que la adición de inóculos de BAL y BAL/CCN tiene un mayor efecto sobre los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos. Se encontró una relación lineal positiva en los salames con cultivo iniciador en comparación con el lote control entre el recuento de BAL y la dosis de cultivo iniciador agregada, y en el pH y el recuento de enterobacterias con el paso de los días de fermentación. Por lo tanto, el trabajo muestra el impacto que tiene la adición de cultivos iniciadores en la seguridad y calidad de los salames.

Tabla 15. Recuentos microbiológicos de salames (Log_{10} UFC/g).

Género	Lote	D0	D2	D7	D14	D21	D28	D35	D49	D63	D77	D95
BAL	Lote I*	$5,23^{A}$	$9,99^{A}$	$8,51^{A}$	$8,37^{A}$	$8,33^{B}$	$8,34^{B}$	$8,31^{B}$	$8,40^{B}$	$8,10^{B}$	$8,18^{B}$	$8,15^{B}$
	Lote II*	$6,33^{B}$	$10,16^{A}$	$8,75^{A}$	$8,40^{A}$	$8,38^{B}$	$8,42^{B}$	$8,42^{B}$	$8,40^{B}$	$8,20^{B}$	$8,33^{B}$	$8,30^{B}$
	Lote III*	$7,33^{C}$	$9,86^{A}$	$9,05^{A}$	$8,31^{A}$	$8,19^{A}$	$7,86^{A}$	$7,79^{A}$	$7,80^{A}$	$7,84^{A}$	$7,75^{A}$	$7,70^{A}$
CCN	Lote I*	$4,79^{A}$	$8,36^{A}$	$8,65^{B}$	$7,74^{B}$	$7,74^{B}$	$6,70^{B}$	$6,55^{B}$	$6,44^{B}$	$5,94^{A}$	$5,92^{A}$	$5,72^{A}$
	Lote II*	$6,23^{B}$	$8,40^{A}$	$9,00^{B}$	$7,70^{B}$	$7,60^{B}$	$6,58^{B}$	$6,46^{B}$	$6,41^{B}$	$5,95^{A}$	$5,94^{A}$	$5,82^{A}$
	Lote III*	$6,61^{C}$	$8,33^{A}$	$7,46^{A}$	$7,17^{A}$	$7,15^{A}$	$6,22^{A}$	$6,04^{A}$	$6,00^{A}$	$5,92^{A}$	$5,89^{A}$	$5,67^{A}$
Enterobacterias	Lote I*	$3,58^{A}$	$3,31^{B}$	$3,09^{B}$	Ausencia							
	Lote II*	$3,60^{A}$	$3,25^{B}$	$3,07^{B}$	Ausencia							
	Lote III*	$3,61^{A}$	$2,74^{A}$	$2,42^{A}$	Ausencia							

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

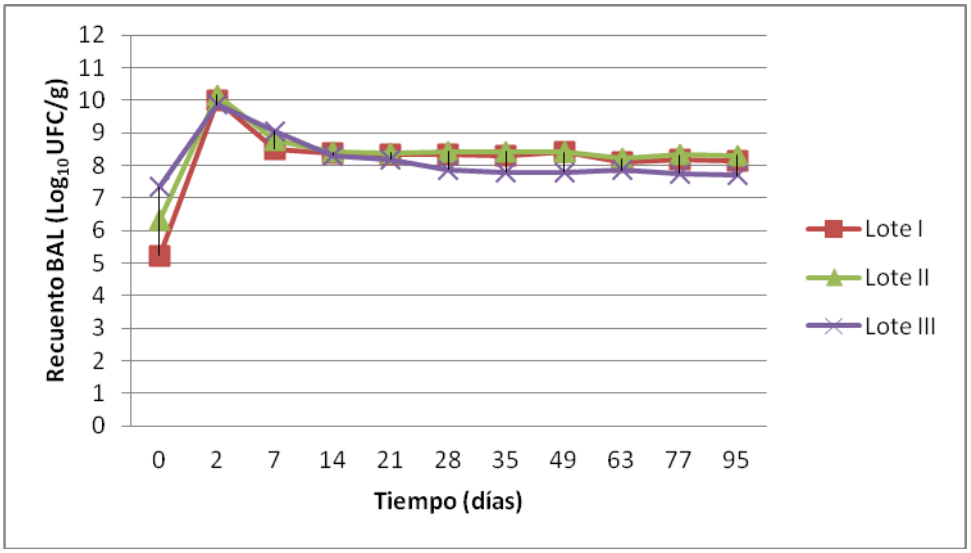


Figura 20. Recuento de bacterias ácido lácticas (log10 UFC/g) durante fermentación (D0, D2), secado/maduración (D7, D14) y conservación (D21, D28, D35, D49, D63, D77, D95).

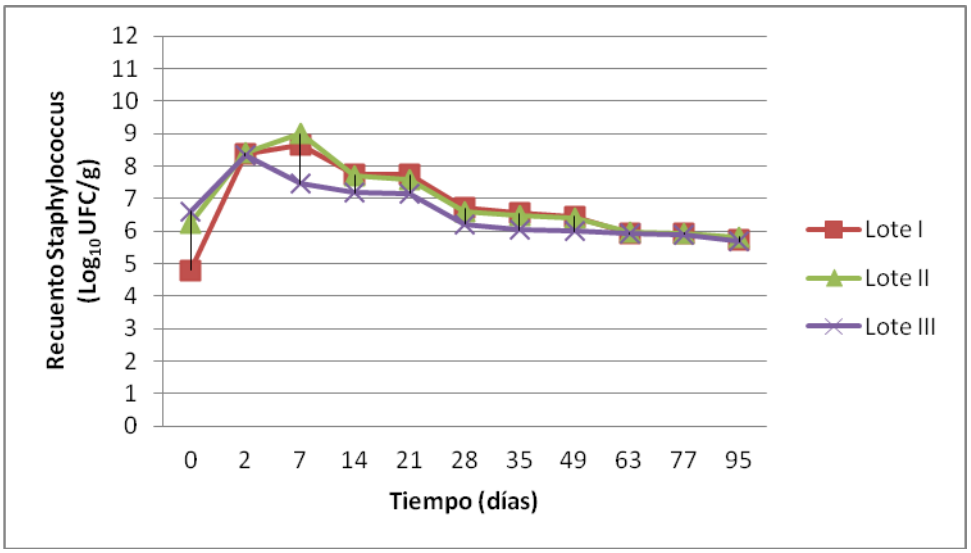


Figura 21. Recuento de *Staphylococcus* (log10 UFC/g) durante fermentación (D0, D2), secado/maduración (D7, D14) y conservación (D21, D28, D35, D49, D63, D77, D95).

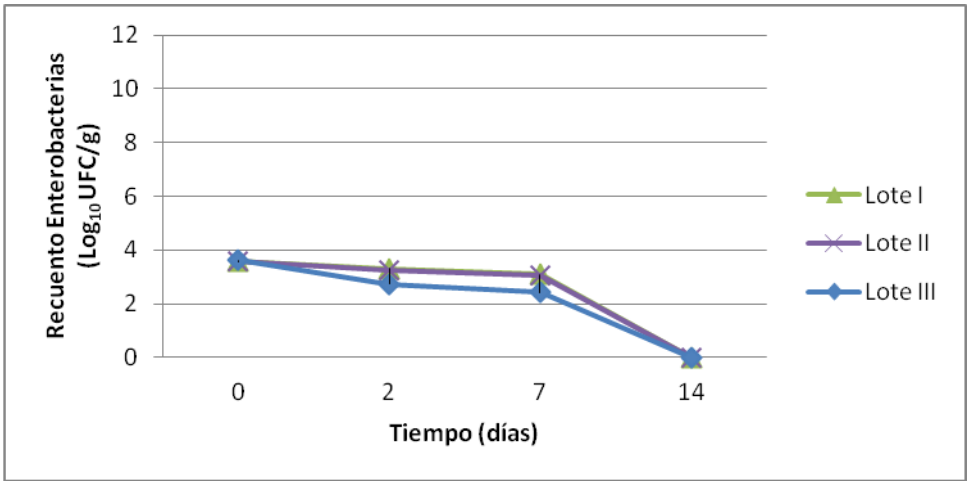


Figura 22. Recuento de enterobacterias (log_{10} UFC/g) durante fermentación (D0, D2), secado/maduración (D7- D14).

IV.14. Aceptabilidad.

Como se puede observar en la Figura N°23, las formulaciones obtuvieron valores entre 4 (Agradable) y 3 (Indiferente). No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) en la aceptabilidad de los salames de los

lotes I y II utilizados como control. Si existen diferencias estadísticamente significativas (p≤0,05) entre el salame experimental (lote III) con respecto a los controles (lote I y II), siendo la aceptabilidad del lote III mayor, con una calificación igual a 4 “agradable” (Fig. 23).

En un estudio realizado por Muthukumarasamy and Holley (2006) utilizando el microorganismo probiótico *Lactobacillus reuteri* para elaborar salames, concluyó que más del 80% de los panelistas informaron que el organismo probiótico en los salames influiría positivamente en su decisión de compra.

En el caso de los productos cárnicos, el crecimiento microbiano afecta gradualmente las propiedades fisicoquímicas, texturales, sensoriales y funcionales de la masa cárnica, lo que da lugar a productos de color, sabor y aroma apreciados (Halagarda and Wójciak, 2022; Sirini *et al*., 2022b).

Las características sensoriales, están relacionadas con lo que el consumidor reconoce como típico del producto. Sin embargo, las características sensoriales de los salames probióticos pueden diferir de las formulaciones tradicionales debido a la producción de diferentes metabolitos, como el ácido láctico producido por las BAL durante la fermentación y el almacenamiento (Bis-Souza *et al*., 2019a; Sirini *et al*., 2021).

En estudios realizados por Pavli *et al*., (2020) en cuanto a la evaluación sensorial, se observaron diferencias entre el tratamiento control y probiótico, las cuales se encontraron en los atributos de enrojecimiento, olor y sabor ácido. Aunque el sabor ácido fue ligeramente más intenso en los salames probióticos, no se consideró desagradable.

Yu, Feng and Sung (2021) estudiaron la influencia de iniciadores mixtos (*Lactiplantibacillus plantarum* CD101 y *Staphylococcus simulans* NJ201) sobre la degradación de proteínas y la liberación de péptidos antioxidantes durante el procesamiento de salames y concluyeron que estos cultivos mixtos podrían acelerar la hidrólisis de proteínas y también podrían retrasar las reacciones oxidativas en salames.

El sabor de los salames está influenciado por varios factores, principalmente la matriz cárnica, la cantidad y el tipo de ingredientes (por ejemplo, sal y especias), pero también la temperatura, el tiempo de procesamiento, el ahumado y la elección del cultivo iniciador (Mejri *et al*., 2017). El sabor básico resulta de la interacción del gusto (principalmente determinado por la producción de ácido láctico y el patrón de

péptidos y aminoácidos libres resultantes de la proteólisis generada) y el aroma (principalmente determinado por los componentes volátiles derivados del metabolismo bacteriano y la autooxidación de lípidos) (Leroy *et al*., 2006; Ordoñez *et al*., 1999). Las enzimas proteolíticas, principalmente las endógenas de la carne, son de gran importancia para el sabor. Mientras que las enzimas microbianas actúan más bien sobre los oligopéptidos liberados durante las últimas etapas de maduración. Los péptidos generados por la proteólisis muscular pueden ser absorbidos por bacterias que los dividen aún más intracelularmente en aminoácidos y pueden convertirlos en componentes aromáticos (Chen *et al*., 2021; Leroy *et al*., 2006; Sirini *et al*., 2022b).

Se cree que la lipólisis juega un papel central en la formación del aroma. Esta conduce a la liberación de ácidos grasos libres y se debe principalmente a las lipasas tisulares. Aunque también se ha descrito actividad lipolítica bacteriana. Los ácidos grasos de cadena corta dan lugar a fuertes olores a queso, mientras que los ácidos grasos de cadena media y larga pueden actuar como precursores. La lipólisis es solo el primer paso del proceso y va seguida de una mayor degradación oxidativa de los ácidos grasos liberados. La microbiota bacteriana juega un papel importante en la oxidación de los ácidos grasos libres (Hugas and Monfort, 1997).

El catabolismo de los carbohidratos es principalmente de origen bacteriano y compuestos como el ácido láctico, el ácido acético, el etanol, la acetoína y el diacetilo pueden jugar un papel en la complejidad del sabor del salame (Leroy *et al*., 2006).

Por tanto, hay que tener en cuenta que la materia prima (p. ej., tipo de carne y especias) y la tecnología de elaboración del salame (p. ej., temperatura de fermentación, salado y tiempo de maduración) interactuarán con el metabolismo del cultivo iniciador (Olesen *et al*., 2004; Palavecino Prpich *et al*., 2021).

La principal contribución de las BAL a la generación de sabor se atribuye a la producción de grandes cantidades de ácido láctico y algo de ácido acético, aunque también producen componentes volátiles a través de la fermentación de carbohidratos (Bis-Souza *et al*., 2019a; Leroy *et al*., 2006). Por lo general, no poseen fuertes propiedades proteolíticas o lipolíticas, aunque se ha observado cierto grado de actividad de peptidasa y lipasa en algunas cepas de carne (Bis-Souza *et al*., 2019a; Leroy *et al*., 2006; Palavecino Prpich *et al*., 2021; Vignolo *et al*., 2010).

En estudios realizados *in vitro* (Agüero *et al*., 2020) se demostró que *L. rhamnosus* Lr-32 es buena productora de ácido láctico y posee actividad proteolítica y lipolítica.

Tal como fue estudiado por otros investigadores (Bis-Souza *et al*., 2019a; Erkkilä *et al*., 2001b; Hammes and Hertel, 1998) la actividad biológica y enzimática, varía entre cepas, dando como resultado diferentes perfiles sensoriales en los salames, esto puede darnos el motivo de la diferente aceptabilidad de los tres tipos de salames. Por otro lado, el lote III (de mayor aceptabilidad) fue el que presentó el pH más alto y el consumidor Argentino está acostumbrado a consumir salames suaves en base a recetas mediterráneas de baja fermentación, rechazando los productos con fermentaciones más bruscas y prolongadas como son las formulaciones de origen centro europeas, con mayor picor y más pungentes.

La incorporación del probiótico *L. reuteri* encapsulado en alginato, en embutidos crudo-curados utilizando como cultivo iniciador *P. pentosaceus y S. carnosus* (F1-100, Hansen®) no generó diferencias significativas entre los tratamientos, logrando niveles de aceptabilidad altos (Muthukumarasamy and Holley, 2006).

Radulović *et al*. (2011), estudiaron el efecto del uso de bacterias probióticas (*L. helveticus* R0052 y *B. longum* R00175) en embutidos con cultivo iniciador, no observaron diferencias para aceptabilidad general entre los tratamientos al día 14, sin embargo, al día 40 presentó mejores características el tratamiento de *L. helveticus* R0052, especialmente en el aroma, sabor y textura.

Summo *et al*. (2010), al estudiar embutidos crudo-curados, almacenados durante períodos prolongados al vacío, observaron que la aceptabilidad disminuye con el tiempo.

Zhang *et al*. (2023) utilizó *Bifidobacterium animalis* A12 para la elaboración de salames. Evaluó la actividad de crecimiento, tolerancia y actividad enzimática de *B. animalis* A12 y su contribución a la textura y sabor de embutidos fermentados. Además, evaluaron la textura sensorial, los componentes del sabor y los nutrientes de los aminoácidos durante el proceso de fermentación. *B. animalis* tuvo alta tolerancia al NaCl y nitrito, y actividades proteasa y lipasa. El pH del salame elaborado con *B. animalis* A12 fue menor que el del salame fermentado sin cultivo iniciador. El mayor contenido de sustancias volátiles de sabor y aminoácidos, así como las características de color y textura de los salames en el grupo experimental

a las 18 h fueron mejores que en otros momentos. Estos resultados sugieren que *B. animalis* A12 tiene potencial para usarse como cultivo iniciador para mejorar el sabor y la textura en salames.

Murahashi *et al*., (2020) elaboró salames utilizando como cultivo iniciador *Lactobacillus sakei* D-1001 o *Lactobacillus salivarius* A001. Una prueba sensorial indicó que la palatabilidad de estos salames era mayor que la de los salames elaborados sin cultivo iniciador, particularmente en términos de dureza y jugosidad. Se consideró que esto se debía a la degeneración de las proteínas y a cambios en las propiedades físicas de los salames como resultado de la fermentación por las BAL. Sin embargo, el sabor de los salames era más ácido que el de los salames en los que no se utilizó cultivo iniciador y, por tanto, inferior.

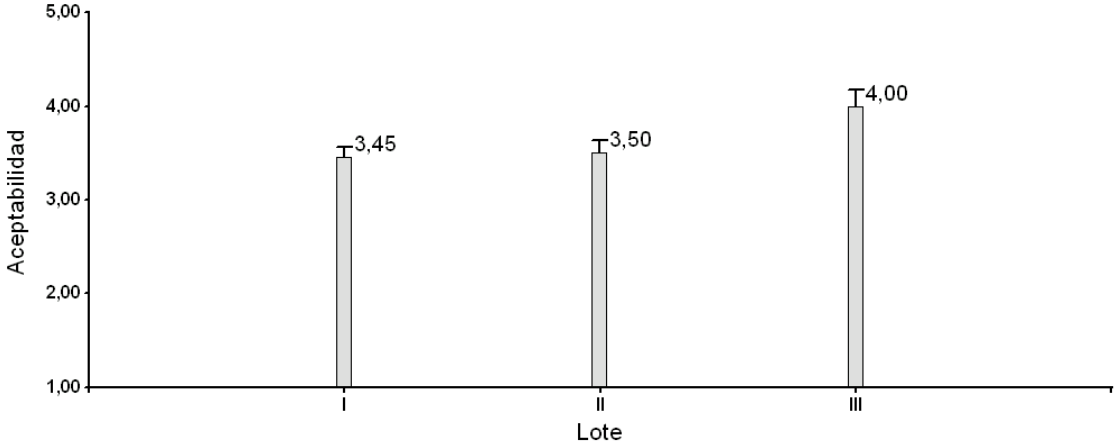


Figura 23. Grado de aceptabilidad de salames.

IV.15. Aislamiento e identificación de *Lactobacillus rhamnosus* Lr-32.

IV.15.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El gen ADNr 16S fue amplificado mediante la técnica de PCR. Las muestras se amplificaron con los genes específicos para *L. rhamnnosus*. Esta técnica permitió identificar a los aislamientos como *L. rhamnosus* sp. (Fig. 24).

El uso de métodos moleculares ha revolucionado la identificación de microorganismos, al mejorar la calidad y eficacia de esta identificación. Algunas de estas metodologías usan la región espaciadora de ADNr o su objetivo. Estas técnicas son útiles tanto para la identificación y detección fiable de diferentes especies bacterianas como para como el seguimiento de la especie (Blaiotta *et al*., 2008). De esta forma, las cepas de un inóculo probiótico se pueden identificar y distinguir de las cepas que comparten el mismo entorno, como los iniciadores en los alimentos (yogur, queso, salames, etc.) (Soto *et al*., 2010). Una de las técnicas utilizadas para identificar especies de *Lactobacillus* en diferentes ambientes es la comparación de secuencias totales o parciales de ADNr 16S (Delfederico *et al*., 2006). Esta técnica permitió identificar que los aislamientos pertenecen al grupo *L. rhamnosus*, especie que no es microbiota nativa en el ambiente de un salame excepto que sea agregada intencionalmente.

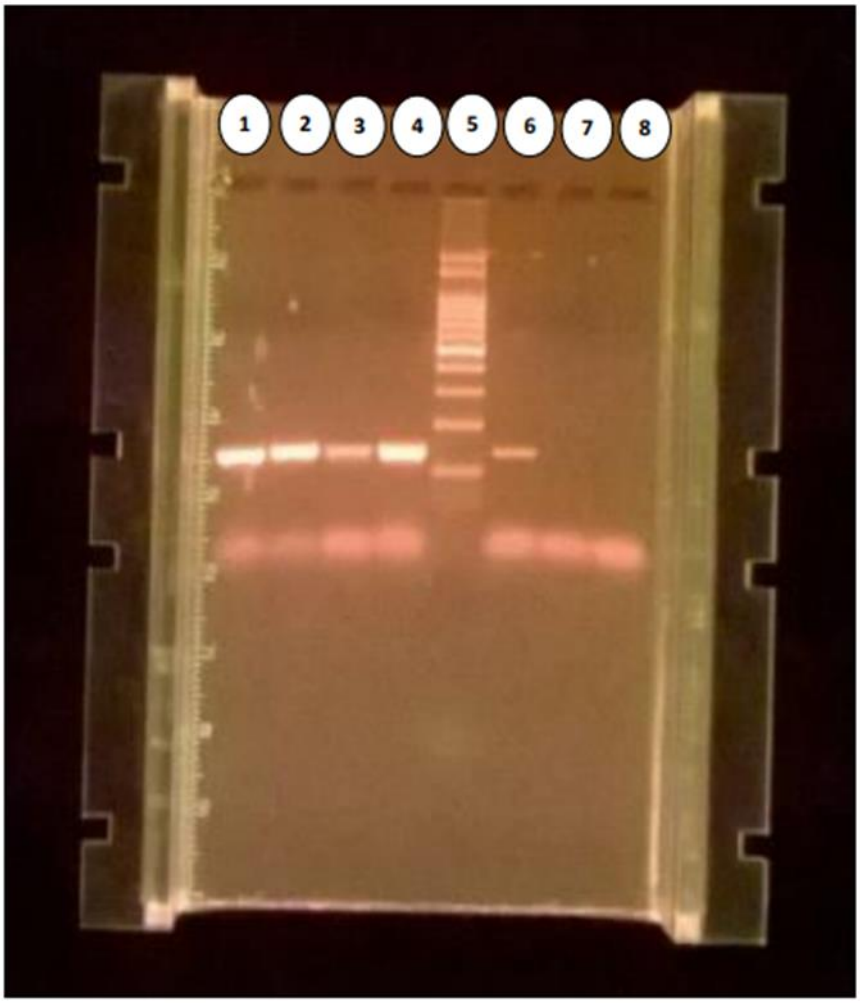


Figura 24. Gel de agarosa con diferentes grupos de restricción.

La primera calle es la cepa de referencia *L. rhamnosus* Lr-32, la calle 2 (D2), calle 3 (D35), calle 4 (D63) y calle 6 (D95) son los aislamientos hechos de los salames a lo largo del tiempo (95 días). Los controles negativos utilizados corresponden a la cepa *L. sakey* (calle 5) y reactivo sin ADN (calle 7 y 8).

IV.15.2. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).

Se aplicó PFGE para determinar la presencia de la cepa inoculada a lo largo del proceso de elaboración y conservación del producto. Los perfiles obtenidos de los aislamientos se compararon con el perfil del inóculo. Los aislamientos coinciden con el genotipo de la cepa inoculada. Este modelo de seguimiento fue utilizado con éxito por otros autores (Blajman *et al*., 2015; Pavli *et al*., 2020; Sirini *et al*., 2022a).

Según el número y el tamaño de los fragmentos pudimos distinguir un solo patrón de restricción cromosómica o “huella digital” para las nueve cepas aisladas, asegurando la presencia de *L. rhamnosus* Lr-32 durante todo el estudio.

PFGE fue una herramienta adecuada para mostrar que el total de los aislamientos obtenidos fueron la misma cepa inoculada (Fig. 25).

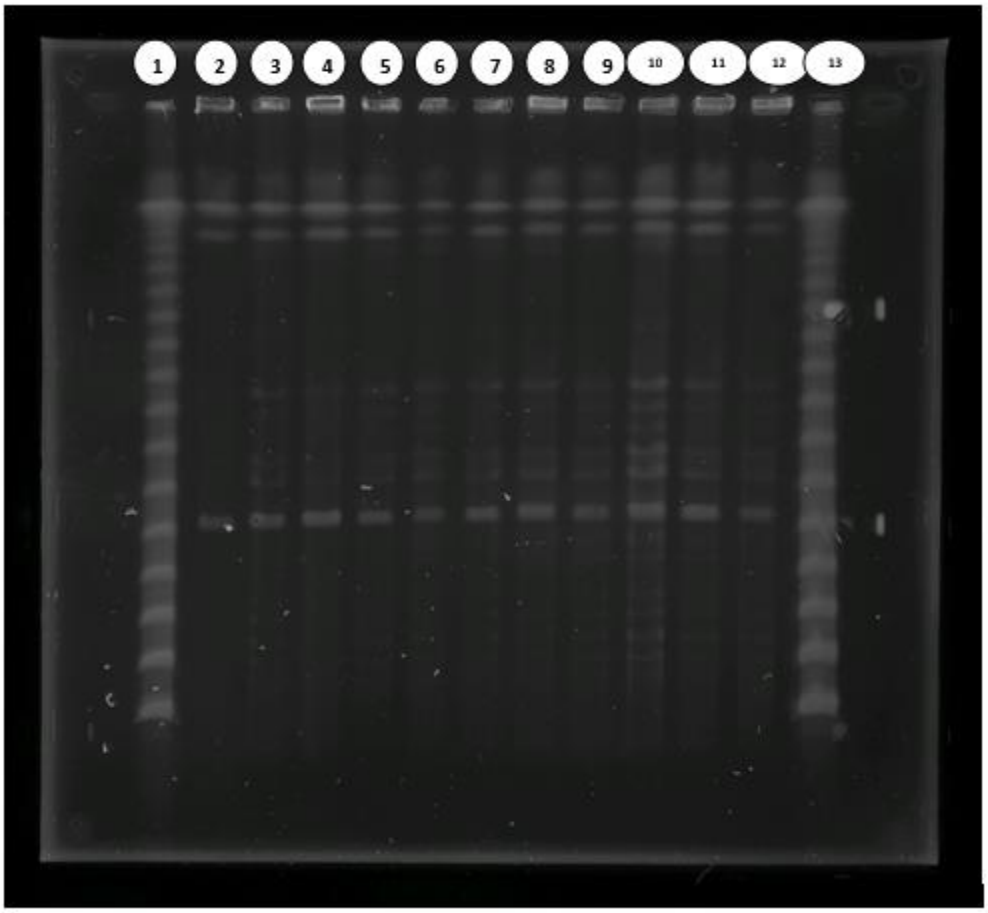


Figura 25. Patrones de PFGE de ADN genómico.

La primera y la última calle son el marcador Lambda, la segunda calle de la izquierda es el control negativo *L. rhamnosus* spp., la tercera calle es la cepa de referencia *L. rhamnosus* Lr-32 inoculada y las calles 4 (D2), calle 5 (D14), calle 6 (D21), calle 7 (D28), calle 8 (D35), calle 9 (D49), calle 10 (D63), calle 11 (D77), calle 12 (D95) son los aislamientos hechos de los salames a lo largo del tiempo (95 días).

IV.16. Tolerancia a la acidez y a las sales biliares.

La resistencia a bajos niveles de pH y a las sales biliares es una característica importante que permite a los *Lactobacillus* sobrevivir y crecer en el tracto intestinal. Esto es una propiedad probiótica muy importante (Sirini *et al*., 2021; Sirini *et al*., 2022b).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) en el crecimiento de los diferentes aislamientos respecto a la cepa *L. rhamnosus* Lr-32

pura inoculada a diferentes niveles de pH y concentraciones de sales biliares (Tabla 17). Las cepas aisladas de los salames fermentados con *L. rhamnosus* Lr-32 tuvieron el mismo comportamiento y crecimiento que la cepa original inoculada.

Los valores de DO_{600} alcanzados en medios con diferentes valores de pHs fueron: medio 1 (pH=6,5) = 1,6; medio 2 (pH=4) = 1,2; en el medio 3 (pH=3) y medio 4 (pH=2) no hubo crecimiento. Los valores de DO_{600} alcanzados en medios con diferentes concentraciones de sales biliares fueron: medio 5 (0% sales biliares) = 1,6; medio 6 (0,15%) = 1,2; medio 7 (0,30%) = 0,8 y medio 8 (0,60%) = 0,3.

El ensayo demostró que la cepa *L. rhamnosus* Lr-32 mantiene sus propiedades probióticas de tolerancia a bajos niveles de pH y concentraciones de sales biliares en el producto elaborado luego de 95 días de conservación.

Estos resultados muestran la capacidad probiótica de supervivencia de los aislamientos a pH tan bajo como 4 dando una concentración de 9 log UFC/ml y a una concentración de sales biliares tan altas como 0,30% dando 8,8 log UFC/ml al igual que la cepa original inoculada luego de 24 h de ensayo. La correlación entre la DO y la UFC está dada según un ensayo realizado previamente (Agüero *et al*., 2020).

Cavalheiro *et al*. (2021) estudiaron el uso de *E. faecium* CECT 410 en salames durante los períodos de maduración y almacenamiento. Los investigadores descubrieron que los valores de pH más bajos eran consecuencia de una mayor acumulación de ácido láctico como resultado del crecimiento de *E. faecium*. Tras 60 días de almacenamiento se pudo considerar un estudio exitoso ya que los recuentos se mantuvieron por encima de 8 log UFC/g.

Hay varios aspectos que son relevantes para poder sobrevivir el pasaje a través del tracto gastro intestinal (TGI) pero lo más importante es tolerar las condiciones ácidas del estómago y las concentraciones de sales biliares encontradas en el intestino.

Estudios *in vitro* que figuran en la ficha técnica de la cepa, han demostrado que *L. rhamnosus* Lr-32 es resistente a bajo pH y sobrevive a las concentraciones de sales biliares presentes en el duodeno, estos resultados se observaron en el ensayo realizado.

La resistencia a la bilis es indicativa de la capacidad de las cepas para sobrevivir a la toxicidad que la bilis ejerce durante el pasaje a través del intestino delgado, e incrementa el potencial de estos microorganismos para ser incorporados en la dieta

de los humanos. La tolerancia ácida es una propiedad que cualquier cepa debería poseer para sobrevivir durante el pasaje gástrico y de esa manera arribar al intestino en mayor número y en mejores condiciones *(*Frizzo *et al.*, 2006; Sirini *et al.*, 2022b*).*

Es esencial en la elección de un microorganismo probiótico su capacidad para alcanzar, sobrevivir y persistir en el medio en el que se pretende que actúe. La cepa debe tolerar la acidez para sobrevivir durante el pasaje gástrico y así llegar al intestino. También debe sobrevivir a la toxicidad que la bilis ejerce durante el pasaje a través del intestino delgado. Por este motivo, es un importante criterio de selección de cepas probióticas (Ammor and Mayo, 2007; Charteris *et al*., 1998; Granato *et al*., 2020; Sirini *et al*., 2021). Las cepas de *L. rhamnosus* muestran una mayor resistencia a valores de pH bajos, que le permite sobrevivir en ambientes como el tracto gastrointestinal (Bertuci *et al*., 2023). El crecimiento de los aislamientos en presencia de diferentes niveles de pH y concentración de sales biliares fue igual al de la cepa inoculada. La característica de tolerar y crecer a bajos niveles de pH y altas concentraciones de sales biliares muestra el mantenimiento de las capacidades probióticas de la cepa en el producto elaborado. Esto permitiría que una vez consumidas puedan tolerar las condiciones adversas del tracto gastrointestinal y ejercer su función.

Tabla 16. Crecimiento (DO_{600}) a diferentes niveles de pHs y concentraciones de sales biliares.

Cepa	pH 6,5	pH 4	pH 3	pH 2	Bilis 0%	Bilis 0,15%	Bilis 0,3%	Bilis 0,6%
Lr-32	$1,6^{A}$	$1,2^{A}$	$0,0^{A}$	$0,0^{A}$	$1,6^{A}$	$1,2^{A}$	$0,8^{A}$	$0,3^{A}$
Aislamiento inicio	$1,6^{A}$	$1,2^{A}$	$0,0^{A}$	$0,0^{A}$	$1,6^{A}$	$1,2^{A}$	$0,8^{A}$	$0,3^{A}$
Aislamiento medio	$1,6^{A}$	$1,2^{A}$	$0,0^{A}$	$0,0^{A}$	$1,6^{A}$	$1,2^{A}$	$0,8^{A}$	$0,3^{A}$
Aislamiento final	$1,6^{A}$	$1,2^{A}$	$0,0^{A}$	$0,0^{A}$	$1,6^{A}$	$1,2^{A}$	$0,8^{A}$	$0,3^{A}$

Aislamiento inicio: D0 y D2
Aislamiento medio: D28 y D50
Aislamiento final: D95
*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p≤ 0,05).

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES FINALES

Según los datos obtenidos las cepas *L. rhamnosus* Lr-32, *L. rhamnosus* R0011, *L. paracasei* Lpc-37, *E. faecium* MXVK29 y *L. casei* Shirota son las principales candidatas para ser utilizadas como iniciadores de embutidos porque mostraron muy buena capacidad para crecer, una alta producción de ácido láctico sin formación de gases, generan un buen crecimiento a las bajas temperaturas a las que se fabrica este producto, demostraron tener capacidad proteolítica y lipolítica que podría contribuir al sabor y no mostraron antagonismo contra el CCN, que normalmente forma parte de la mezcla del cultivo iniciador. Estas cepas no exhibieron actividad descarboxilasa de aminoácidos, un requisito clave para la selección de un nuevo cultivo iniciador de BAL seguro. Además, podrían prevenir el crecimiento de la microbiota nativa productora de aminas biogénicas, ayudando a producir un producto más seguro. Las cepas mostraron actividad antimicrobiana frente a microorganismos dañinos frecuentemente asociados al embutido, lo que podría contribuir a mejorar la calidad higiénica del producto y prevenir posibles enfermedades.

La base teórica para la selección de un nuevo cultivo iniciador incluye aspectos tecnológicos (crecimiento en la matriz alimenticia, propiedades sensoriales, estabilidad y viabilidad) y de seguridad como se mencionó anteriormente. Los efectos beneficiosos de las BAL se han atribuido a su capacidad para suprimir el crecimiento de patógenos, probablemente mediante la secreción de sustancias antibacterianas como el ácido láctico y las bacteriocinas.

De las cepas antes mencionadas, *L. rhamnosus* Lr-32 fue la cepa que mejor toleró los niveles de sal, nitrito y el bajo pH durante las etapas simuladas de fermentación y maduración del embutido y por lo tanto fue la cepa seleccionada para elaborar salames.

Los salames elaborados con la cepa *L. rhamnosus* Lr-32 obtuvieron un buen descenso de pH, alcanzando un valor final de 5,6. Los valores obtenidos de pH durante el ensayo se corresponden a embutidos crudo-curados de baja fermentación. La pérdida de peso al final del período de maduración fue del 34%, este valor, es reportado como adecuado, ya que se considera el rango de 30 a 40%

como ideal para salames. Se reportaron valores más altos de Luminosidad (L*) a las 48 h de procesado, que posteriormente disminuyen durante la etapa de madurado y hacia el final del ensayo, dado por la acidificación, la desnaturalización proteica y el agua en superficie. Con respecto a los valores de la coordenada a*, se observó un aumento en el enrojecimiento en la coordenada dado por la desnaturalización ácida del hemopigmento. La coordenada b* disminuye con el paso del tiempo. El número de BAL creció en los salames durante el período de fermentación y maduración como era esperado. Luego disminuyó hacia el final de la etapa de conservación, pero alcanzó al día 95 recuentos de 7,75 $\log_{10}$ UFC/g. Un aspecto muy importante del ensayo, es que *L. rhamnosus* Lr-32 mantiene durante un largo período (95 días) recuentos tan altos, que son necesarios en un alimento, como un primer requisito, para que un probiótico pueda ejercer su función al ser consumido. Un comportamiento similar se evidenció para los micrococos llegando al día 95 con recuentos de 5,92 $\log_{10}$ UFC/g. El número de enterobacterias disminuyó significativamente durante la etapa de fermentación y los primeros 7 días, detectándose ausencia al día 14, estos resultados pueden relacionarse con las pruebas de antagonismo realizadas *in vitro* donde *L. rhamnosus* Lr-32 produce sustancias que inhiben el crecimiento de enterobacterias tales como *E. coli* y Salmonella. Estos salames fueron los que tuvieron mayor aceptabilidad por parte de los consumidores. Con respecto al monitoreo del inóculo, el medio de cultivo MRS-V a 43°C en anaerobiosis fue indicado para el recuento y aislamiento de *L. rhamnosus* Lr-32. En este medio las colonias crecen mostrando una morfología muy distintiva, de colonias grandes, cremosas con bordes irregulares. Estas colonias se utilizaron para realizar la identificación de la cepa mediante PCR, esta técnica permitió identificar que los aislamientos pertenecen al grupo *L. rhamnosus*, cepa que no es microbiota nativa en el ambiente de un salame excepto que sea agregada intencionalmente. Luego mediante PFGE se logró demostrar que el total de los aislamientos obtenidos fueron la misma cepa inoculada. Con lo cual podemos decir que *L. rhamnosus* Lr-32 se mantuvo viable durante toda la vida útil del producto (95 días) y a niveles que son los necesarios para ejercer su función como microorganismo probiótico. Finalmente, las pruebas de tolerancia a la acidez y sales biliares, demostraron que la cepa mantiene sus propiedades probióticas en el producto elaborado. Esto permitiría que una vez consumidas puedan tolerar las condiciones adversas del tracto gastrointestinal y ejercer su función.

La novedad de este trabajo fue estudiar cepas de probióticos existentes para conocer su capacidad de actuar como iniciador de la fermentación y demostrar que la cepa probiótica podría usarse sin combinarse con un cultivo iniciador comercial. Se espera que la cepa cumpla ambas funciones siendo a la vez un iniciador como un microorganismo benéfico.

El gran avance que se podría lograr en la ciencia de la carne utilizando microorganismos probióticos como iniciadores sería un producto cárnico funcional con mejoras en el aspecto de seguridad del producto, potenciales beneficios para la salud del consumidor y podría mejorar la imagen negativa que algunos consumidores tienen sobre los embutidos.

Se requiere más investigación para encontrar los posibles efectos beneficiosos de estos salames funcionales sobre la salud humana. Los próximos pasos en esta área de investigación serian experimentos *in vivo* en animales y clínicos en humanos que demuestren efectos beneficiosos tras el consumo de este producto.

El objetivo final es la producción industrial futura de salames con bacterias ácido lácticas probióticas.

CAPITULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agüero N.d.L., Frizzo L.S., Ouwehand A.C., Aleu G., Rosmini M.R. (2020) Technological Characterisation of Probiotic Lactic Acid Bacteria as Starter Cultures for Dry Fermented Sausages. Foods 9:596. DOI: 10.3390/foods9050596.

Alshahrani S.M., Fraser G.E., Sabaté J., Knutsen R., Shavlik D., Mashchak A., Lloren J.I., Orlich M.J. (2019) Red and processed meat and mortality in a low meat intake population. Nutrients 11:622. DOI: 10.3390/nu11030622.

Alvarez-Cisneros Y.M., Fernández F.J., Sainz-Espuñez T., Ponce-Alquicira E. (2017) Assessment of virulence factors, antibiotic resistance and amino-decarboxylase activity in Enterococcus faecium MXVK29 isolated from Mexican chorizo. Letters in Applied Microbiology 64:171-176. DOI: 10.1111/lam.12699.

Alvarez-Cisneros Y.M., Fernandez F.J., Wacher-Rodarte C., Aguilar M.B., Sainz Espunes T.d.R., Ponce-Alquicira E. (2010) Biochemical characterization of a bacteriocin-like inhibitory substance produced by Enterococcus faecium MXVK29, isolated from Mexican traditional sausage. Journal of the Science of Food and Agriculture 90:2475-2481. DOI: 10.1002/jsfa.4109.

Alvarez J.Á.P. (1996) Contribucion al estudio objetivo del color en productos carnicos crudo-curados. Doctoral dissertation. Universitat Politécnica de Valéncia.

Ammor M.S., Mayo B. (2007) Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. Meat Science 76:138-146. DOI: 10.1016/j.meatsci.2006.10.022.

Aoyagi Y., Park S., Matsubara S., Honda Y., Amamoto R., Kushiro A., Miyazaki K., Shephard R. (2016) Habitual intake of fermented milk products containing Lactobacillus casei strain Shirota and a reduced risk of hypertension in older people. Beneficial Microbes 8:23-29. DOI: 10.3920/BM2016.0135.

Arihara K. (2006) Strategies for designing novel functional meat products. Meat Science 74:219-29. DOI: 10.1016/j.meatsci.2006.04.028.

Arihara K., Ota H., Itoh M., Kondo Y., Sameshima T., Yamanaka H., Akimoto M., Kanai S., Miki T. (1998) Lactobacillus acidophilus group lactic acid bacteria applied to meat fermentation. Journal of Food Science 63:544-547. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1998.tb15782.x.

Aro Aro J.M., Nyam-Osor P., Tsuji K., Shimada K.-i., Fukushima M., Sekikawa M. (2010) The effect of starter cultures on proteolytic changes and amino acid content in fermented sausages. Food Chemistry 119:279-285.

Aymerich T., Martin B., Garriga M., Hugas M. (2003) Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. Applied and Environmental Microbiology 69:4583-4594. DOI: 10.1128/AEM.69.8.4583-4594.2003.

Balev D., Vulkova T., Dragoev S., Zlatanov M., Bahtchevanska S. (2005) A comparative study on the effect of some antioxidants on the lipid and pigment oxidation in dry-fermented sausages. International Journal of Food Science & Technology 40:977-983. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2005.01031.x.

Barat J., Toldrá F. (2011) Reducing salt in processed meat products. Processed Meats:331-345. DOI: 10.1533/9780857092946.2.331.

Barbut S. (2007) Handbook of Fermented Meat and Poultry, Texture, Blackwell Publishing Ames, IA. pp. 217-226.

Bedia M., Méndez L., Bañón S. (2011) Evaluation of different starter cultures (Staphylococci plus Lactic Acid Bacteria) in semi-ripened Salami stuffed in swine gut. Meat Science 87:381-386. DOI: 10.1016/j.meatsci.2010.11.015.

Behera S.S., Panda S.K. (2020) Ethnic and industrial probiotic foods and beverages: efficacy and acceptance. Current Opinion in Food Science 32:29-36. DOI: 10.1016/j.cofs.2020.01.006.

Beriain M., Gómez I., Petri E., Insausti K., Sarriés M. (2011) The effects of olive oil emulsified alginate on the physico-chemical, sensory, microbial, and fatty acid profiles of low-salt, inulin-enriched sausages. Meat Science 88:189-197. DOI: 10.1016/j.meatsci.2010.12.024.

Berry C. (2002) Functional foods. QJM 95:639-640. DOI: 10.1093/qjmed/95.9.639.

Bertuci M.L., Alves Junior C.A., Souza C.V.B., Penna A.L.B., da Silva Barretto A.C. (2023) Bio preservation capacity of potentially probiotic Lacticaseibacillus strains in fermented sausage. International Journal of Food Science & Technology 58:6253-6262. DOI: 10.1111/ijfs.16726.

Bis-Souza C., Barba F., Lorenzo J., Penna A.B., Barretto A. (2019a) New strategies for the development of innovative fermented meat products: a review regarding the incorporation of probiotics and dietary fibers. Food Reviews International 35:467-484. DOI: 10.1080/87559129.2019.1584816.

Bis-Souza C.V., Pateiro M., Domínguez R., Lorenzo J.M., Penna A.L.B., da Silva Barretto A.C. (2019b) Volatile profile of fermented sausages with commercial probiotic strains and fructooligosaccharides. Journal of food science and technology 56:5465-5473.

Bis-Souza C.V., Pateiro M., Domínguez R., Penna A.L., Lorenzo J.M., Barretto A.C.S. (2020) Impact of fructooligosaccharides and probiotic strains on the quality parameters of low-fat Spanish Salchichón. Meat Science 159:107936. DOI: 10.1016/j.meatsci.2019.107936.

Blaiotta G., Fusco V., Ercolini D., Aponte M., Pepe O., Villani F. (2008) Lactobacillus strain diversity based on partial hsp60 gene sequences and design of PCR-restriction fragment length polymorphism assays for species identification and differentiation. Applied and Environmental Microbiology 74:208-215. DOI: 10.1128/AEM.01711-07.

Blajman J., Gaziano C., Zbrun M.V., Soto L., Astesana D., Berisvil A., Scharpen A.R., Signorini M., Frizzo L. (2015) In vitro and in vivo screening of native lactic acid bacteria toward their selection as a probiotic in broiler chickens. Research in veterinary science 101:50-56. DOI: 10.1016/j.rvsc.2015.05.017.

Borah D., Gogoi O., Adhikari C., Kakoti B. (2016) Isolation and characterization of the new indigenous Staphylococcus sp. DBOCP06 as a probiotic bacterium from traditionally fermented fish and meat products of Assam state. Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences 3:232-240. DOI: 10.1016%2Fj.ejbas.2016.06.001.

Brusa V., Prieto M., Campos C.A., Epszteyn S., Cuesta A., Renaud V., Schembri G., Vanzini M., Michanie S., Leotta G.A. (2021) Quantitative risk assessment of listeriosis associated with fermented sausage and dry-cured pork shoulder consumption in Argentina. DOI: 10.1016/j.foodcont.2020.107705.

Buckenhüskes H.J. (1993) Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. FEMS Microbiology Reviews 12:253-271. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1993.tb00022.x.

Bungenstock L., Abdulmawjood A., Reich F. (2020) Evaluation of antibacterial properties of lactic acid bacteria from traditionally and industrially produced fermented

sausages from Germany. PLoS ONE 15:e0230345. DOI: 10.1371/journal.pone.0230345.g004.

CAA. (2023) Codigo Alimentario Argentino. Disponible en: www.argentina.gob.ar/sites/default/files/anmat_caa_capitulo_vi_carneos_act_2023_5.pdf.

Cadwallader K.R. (2007) Wood smoke flavor. Handbook of meat, poultry and seafood quality:201-210.

Cai Y., Benno Y., Nakase T., Oh T.-K. (1998) Specific probiotic characterization of Weissella hellenica DS-12 isolated from flounder intestine. The Journal of general and applied microbiology 44:311-316. DOI: 10.2323/jgam.44.311.

Campagnol P.C.B., dos Santos B.A., Terra N.N., Pollonio M.A.R. (2012) Lysine, disodium guanylate and disodium inosinate as flavor enhancers in low-sodium fermented sausages. Meat Science 91:334-338. DOI: 10.1016/j.meatsci.2012.02.012.

Campagnol P.C.B., dos Santos B.A., Wagner R., Terra N.N., Pollonio M.A.R. (2011) The effect of yeast extract addition on quality of fermented sausages at low NaCl content. Meat Science 87:290-298. DOI: 10.1016/j.meatsci.2010.11.005.

Cañeque V., Sañudo C. (2000) Metodología para el estudio de la calidad de la canal y de la carne en rumiantes, Ministerio de Ciencia y Tecnología, Madrid (España).

Castellano P., Belfiore C., Fadda S., Vignolo G. (2008) A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. Meat Science 79:483-499. DOI: 10.1016/j.meatsci.2007.10.009.

Cavalheiro C.P., Ruiz-Capillas C., Herrero A.M., Pintado T. (2021) Dry-fermented sausages inoculated with Enterococcus faecium CECT 410 as free cells or in alginate beads. LWT 139:110561.

Cenci-Goga B., Rossitto P., Sechi P., Parmegiani S., Cambiotti V., Cullor J. (2012) Effect of selected dairy starter cultures on microbiological, chemical and sensory characteristics of swine and venison (Dama dama) nitrite-free dry-cured sausages. Meat Science 90:599-606. DOI: 10.1016/j.meatsci.2011.09.022.

Cittadini A., Domínguez R., Gómez B., Pateiro M., Pérez-Santaescolástica C., López-Fernández O., Sarriés M.V., Lorenzo J.M. (2020) Effect of NaCl replacement by other chloride salts on physicochemical parameters, proteolysis and lipolysis of dry-cured foal “cecina”. Journal of food science and technology 57:1628-1635. DOI: 10.1007/s13197-019-04195-6.

Cocconcelli P.S. (2007) Starter cultures: bacteria. Handbook of fermented meat and poultry:137-145.

Cocolin L., Dolci P., Rantsiou K., Urso R., Cantoni C., Comi G. (2009) Lactic acid bacteria ecology of three traditional fermented sausages produced in the North of Italy as determined by molecular methods. Meat Science 82:125-132. DOI: 10.1016/j.meatsci.2009.01.004.

Corral S., Salvador A., Flores M. (2013) Salt reduction in slow fermented sausages affects the generation of aroma active compounds. Meat Science 93:776-785. DOI: 10.1016/j.meatsci.2012.11.040.

Champagne C.P., Ross R.P., Saarela M., Hansen K.F., Charalampopoulos D. (2011) Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. International Journal of Food Microbiology 149:185-193. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.005.

Charteris C., Kelly K., Morelli M., Collins C. (1998) Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in the upper human gastrointestinal tract.

Journal of Applied Microbiology 84:759-768. DOI: 10.1046/j.1365-2672.1998.00407.x.

Chen Q., Liu Q., Sun Q., Kong B., Xiong Y. (2015) Flavour formation from hydrolysis of pork sarcoplasmic protein extract by a unique LAB culture isolated from Harbin dry sausage. Meat Science 100:110-117. DOI: 10.1016/j.meatsci.2014.10.001.

Chen Q., Kong B., Han Q., Xia X., Xu L. (2017) The role of bacterial fermentation in lipolysis and lipid oxidation in Harbin dry sausages and its flavour development. LWT 77:389-396. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.11.075.

Chen X., Mi R., Qi B., Xiong S., Li J., Qu C., Qiao X., Chen W., Wang S. (2021) Effect of proteolytic starter culture isolated from Chinese Dong fermented pork (Nanx Wudl) on microbiological, biochemical and organoleptic attributes in dry fermented sausages. Food science and human wellness 10:13-22.

da Costa W.K.A., de Souza G.T., Brandão L.R., de Lima R.C., Garcia E.F., dos Santos Lima M., de Souza E.L., Saarela M., Magnani M. (2018) Exploiting antagonistic activity of fruit-derived Lactobacillus to control pathogenic bacteria in fresh cheese and chicken meat. Food Research International 108:172-182. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.03.045.

De Macedo R.E.F., Pflanzer S.B., Gomes C.L. (2012) Probiotic meat products.

De Mey E., De Klerck K., De Maere H., Dewulf L., Derdelinckx G., Peeters M.-C., Fraeye I., Vander Heyden Y., Paelinck H. (2014) The occurrence of N-nitrosamines, residual nitrite and biogenic amines in commercial dry fermented sausages and evaluation of their occasional relation. Meat Science 96:821-828. DOI: 10.1016/j.meatsci.2013.09.010.

De Vuyst L., Falony G., Leroy F. (2008) Probiotics in fermented sausages. Meat Science 80:75-78. DOI: 10.1016/j.meatsci.2008.05.038.

Deibel R., Niven C. (1957) Pediococcus cerevisiae: a starter culture for summer sausage, Bacteriol. Proc. pp. 15.

Delfederico L., Hollmann A., Martínez M., Iglesias N.G., De Antoni G., Semorile L. (2006) Molecular identification and typing of lactobacilli isolated from kefir grains. Journal of Dairy Research 73:20-27. DOI: 10.1017/S0022029905001408.

Demeyer D. (2004) Meat fermentation: Principles and applications. FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-:353-368.

dos Santos Cruxen C.E., Funck G.D., Haubert L., da Silva Dannenberg G., de Lima Marques J., Chaves F.C., da Silva W.P., Fiorentini Â.M. (2019) Selection of native bacterial starter culture in the production of fermented meat sausages: Application potential, safety aspects, and emerging technologies. Food Research International. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.04.018.

Doulgeraki A.I., Paramithiotis S., Kagkli D.M., Nychas G.-J.E. (2010) Lactic acid bacteria population dynamics during minced beef storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. Food Microbiology 27:1028-1034. DOI: 10.1016/j.fm.2010.07.004.

Drosinos E., Mataragas M., Xiraphi N., Moschonas G., Gaitis F., Metaxopoulos J. (2005) Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. Meat Science 69:307-317. DOI: 10.1016/j.meatsci.2004.07.012.

Drosinos E.H., Paramithiotis S., Kolovos G., Tsikouras I., Metaxopoulos I. (2007) Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece. Food Microbiology 24:260-270. DOI: 10.1016/j.fm.2006.05.001.

Erkkilä S., Petäjä E. (2000) Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. Meat Science 55:297-300.

Erkkilä S., Suihko M.-L., Eerola S., Petäjä E., Mattila-Sandholm T. (2001a) Dry sausage fermented by Lactobacillus rhamnosus strains. International Journal of Food Microbiology 64:205-210. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00457-8.

Erkkilä S., Petäjä E., Eerola S., Lilleberg L., Mattila-Sandholm T., Suihko M.L. (2001b) Flavour profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter cultures. Meat Science 58:111-116. DOI: 10.1016/S0309-1740(00)00135-2.

Evans M., Salewski R., Christman M., Girard S., Tompkins T. (2016) Effectiveness of Lactobacillus helveticus and Lactobacillus rhamnosus for the management of antibiotic-associated diarrhoea in healthy adults: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. The British journal of nutrition:1-10. DOI: 10.1017/S0007114516001665.

Fadda S., Vignolo G., Oliver G. (2001) Tyramine degradation and tyramine/histamine production by lactic acid bacteria and Kocuria strains. Biotechnology Letters 23:2015-2019. DOI: 10.1023/A:1013783030276.

Farkhondeh T., Tabatabaei Yazdi F., Edalatiane M.R. (2023) Evaluation of pathogenicity indicators and technological properties of Enterococcus faecium isolates obtained from traditional Iranian cheeses. Journal of food science and technology (Iran) 20:69-87. DOI: 10.22034/FSCT.19.135.69.

Fernández-López J. (1998) Estudio del color por métodos objetivos en sistemas modelos de pastas de embutidos crudo-curados. Tesis Doctoral. . Departamento de Producción animal. Universidad de Murcia. Murcia.

Fernández-López J., Sayas-Barberá E., Muñoz T., Sendra E., Navarro C., Pérez-Alvarez J. (2008) Effect of packaging conditions on shelf-life of ostrich steaks. Meat Science 78:143-152. DOI: 10.1016/j.meatsci.2007.09.003.

Flores J. (1997) Mediterranean vs northern European meat products. Processing technologies and main differences. Food Chemistry 59:505-510. DOI: 10.1016/S0308-8146(97)00011-3.

Fontana C., Cocconcelli P.S., Vignolo G. (2005) Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages. International Journal of Food Microbiology 103:131-142. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.046.

Foster L., Tompkins T., Dahl W. (2011) A comprehensive post-market review of studies on a probiotic product containing Lactobacillus helveticus R0052 and Lactobacillus rhamnosus R0011. Beneficial Microbes 2:319-334.

Fraqueza M.J., Laranjo M., Elias M., Patarata L. (2021) Microbiological hazards associated with salt and nitrite reduction in cured meat products: Control strategies based on antimicrobial effect of natural ingredients and protective microbiota. Current Opinion in Food Science 38:32-39. DOI: 10.1016/j.cofs.2020.10.027.

Frizzo L.S., Soto L.P., Bertozzi I., Sequeira G., Marti L.E., Rosmini M.R. (2006) Evaluación in vitro de las capacidades probióticas microbianas orientadas al diseño de inóculos probióticos multiespecie para ser utilizados en la crianza de terneros. Revista FAVE-Ciencias Veterinarias 5:69-80.

Granato D., Nunes D.S., Barba F.J. (2017) An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. Trends in Food Science & Technology 62:13-22. DOI: 10.1016/j.tifs.2016.12.010.

Granato D., Barba F.J., Bursać Kovačević D., Lorenzo J.M., Cruz A.G., Putnik P. (2020) Functional foods: Product development, technological trends, efficacy testing, and safety. Annual review of food science and technology 11:93-118. DOI: 10.1146/annurev-food-032519-051708.

Hadinia N., Dovom M.R.E., Yavarmanesh M. (2022) The effect of fermentation conditions (temperature, salt concentration, and pH) with lactobacillus strains for producing short chain fatty acids. LWT 165:113709. DOI: 10.1016/j.lwt.2022.113709.

Halagarda M., Wójciak K.M. (2022) Health and safety aspects of traditional European meat products. A review. Meat Science 184:108623. DOI: 10.1016/j.meatsci.2021.108623.

Hammes W., Hertel C. (1998) New developments in meat starter cultures. Meat Science 49:S125-S138.

Hammes W.P., Bantleon A., Min S. (1990) Lactic acid bacteria in meat fermentation. FEMS Microbiology Reviews 7:165-173. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1990.tb04886.x.

Harrigan W.F. (1998) Laboratory Methods in Food Microbiology Academic Press.

Hartemink R., Domenech V.R., Rombouts F.M. (1997) LAMVAB—A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. Journal of Microbiological Methods 29:77-84.

Heinz G., Hautzinger P. (2007) Meat processing technology for small to medium scale producers. RAP Publication (FAO).

Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J., Pot B., Morelli L., Canani R.B., Flint H.J., Salminen S. (2014) Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nature reviews Gastroenterology & hepatology. DOI: 10.1038/nrgastro.2014.66.

Hitzel A., Pöhlmann M., Schwägele F., Speer K., Jira W. (2013) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and phenolic substances in meat products smoked with different types of wood and smoking spices. Food Chemistry 139:955-962. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.02.011.

Honikel K.-O. (2008) The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. Meat Science 78:68-76. DOI: 10.1016/j.meatsci.2007.05.030.

Hospital X.F., Hierro E., Fernández M. (2012) Survival of Listeria innocua in dry fermented sausages and changes in the typical microbiota and volatile profile as affected by the concentration of nitrate and nitrite. International Journal of Food Microbiology 153:395-401. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.032.

Hugas M., Monfort J.M. (1997) Bacterial starter cultures for meat fermentation. Food Chemistry 59:547-554. DOI: 10.1016/S0308-8146(97)00005-8.

Hugas M., Garriga M., Aymerich T., Monfort J.M. (1993) Biochemical characterization of lactobacilli from dry fermented sausages. International Journal of Food Microbiology 18:107-113. DOI: 10.1016/0168-1605(93)90215-3.

Hui Y. (2012) Hazard analysis and critical control point system. Handbook of meat and meat processing:741-767.

Incze K. (2007) European products. Handbook of fermented meat and poultry 1:307-318.

Inguglia E.S., Zhang Z., Tiwari B.K., Kerry J.P., Burgess C.M. (2017) Salt reduction strategies in processed meat products–A review. Trends in Food Science & Technology 59:70-78. DOI: 10.1016/j.tifs.2016.10.016.

Janssens M., Myter N., De Vuyst L., Leroy F. (2012) Species diversity and metabolic impact of the microbiota are low in spontaneously acidified Belgian sausages with an added starter culture of Staphylococcus carnosus. Food Microbiology 29:167-177. DOI: 10.1016/j.fm.2011.07.005.

Jiménez-Colmenero F., Ventanas J., Toldrá F. (2010) Nutritional composition of dry-cured ham and its role in a healthy diet. Meat Science 84:585-593. DOI: 10.1016/j.meatsci.2009.10.029.

Kamal G.M., Zubairi W., Uddin J., Hashmi M.I.U., Khalid M., Shabir A. (2022) Biogenic Amines, Handbook of Plant and Animal Toxins in Food, CRC Press. pp. 411-432.

Kaur R., Sharma M. (2019) Cereal polysaccharides as sources of functional ingredient for reformulation of meat products: A review. Journal of Functional Foods 62:103527. DOI: 10.1016/j.jff.2019.103527.

Kechagia M., Basoulis D., Konstantopoulou S., Dimitriadi D., Gyftopoulou K., Skarmoutsou N., Fakiri E.M. (2013) Health benefits of probiotics: a review. International Scholarly Research Notices 2013. DOI: 10.5402/2013/481651.

Khan M.I., Arshad M.S., Anjum F.M., Sameen A., Gill W.T. (2011) Meat as a functional food with special reference to probiotic sausages. Food Research International 44:3125-3133. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.07.033.

Kim M., Chun J. (2005) Bacterial community structure in kimchi, a Korean fermented vegetable food, as revealed by 16S rRNA gene analysis. International Journal of Food Microbiology 103:91-96. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.030.

Kołożyn-Krajewska D., Dolatowski Z.J. (2012) Probiotic meat products and human nutrition. Process Biochemistry 47:1761-1772. DOI: 10.1016/j.procbio.2012.09.017.

Korkeala H., Alanko T., Tiusanen T. (1992) Effect of sodium nitrite and sodium chloride on growth of lactic acid bacteria. Acta Vet Scand 33:27-32.

Kumar P., Chatli M., Verma A.K., Mehta N., Malav O., Kumar D., Sharma N. (2017) Quality, functionality, and shelf life of fermented meat and meat products: A review. Critical reviews in food science and nutrition 57:2844-2856. DOI: 10.1080/10408398.2015.1074533.

Landeta G., Curiel J.A., Carrascosa A.V., Muñoz R., De Las Rivas B. (2013) Technological and safety properties of lactic acid bacteria isolated from Spanish dry-cured sausages. Meat Science 95:272-280. DOI: 10.1016/j.meatsci.2013.05.019.

Laranjo M., Potes M.E., Elias M. (2019) Role of starter cultures on the safety of fermented meat products. Frontiers in Microbiology 10:853. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00853.

Lebert I., Leroy S., Talon R. (2007) Microorganisms in traditional fermented meats. Handbook of fermented meat and poultry:113-124.

Lei M., Guo C., Wang D., Zhang C., Hua L. (2017) The effect of probiotic Lactobacillus casei Shirota on knee osteoarthritis: a randomised double-blind, placebo-controlled clinical trial. Beneficial Microbes 8:697-703. DOI: 10.3920/BM2016.0207.

Leroy F., De Vuyst L. (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends in Food Science & Technology 15:67-78. DOI: 10.1016/j.tifs.2003.09.004.

Leroy F., Verluyten J., De Vuyst L. (2006) Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. International Journal of Food Microbiology 106:270-285. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.027.

Lewus C.B., Kaiser A., Montville T.J. (1991) Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. Appl Environ Microbiol 57:1683-8.

Lin J., Zhang Y., He C., Dai J. (2018) Probiotics supplementation in children with asthma: A systematic review and meta-analysis. Journal of paediatrics and child health 54:953-961. DOI: 10.1111/jpc.14126.

Liu Y.-l., Wan Z., Yang Z.-y., Yu Q.-l., Li L., Wang J. (2020) Recent progress in understanding the contribution of lactic acid bacteria to flavor formation in salami: a review. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-20200416-204.

Lu S., Xu X., Zhou G., Zhu Z., Meng Y., Sun Y. (2010) Effect of starter cultures on microbial ecosystem and biogenic amines in fermented sausage. Food Control 21:444-449. DOI: 10.1016/j.foodcont.2009.07.008.

Lucas-González R., Pellegrini M., Viuda-Martos M., Pérez-Álvarez J.Á., Fernández-López J. (2019) Persimmon (Diospyros kaki Thunb.) coproducts as a new ingredient in pork liver pâté: influence on quality properties. International Journal of Food Science & Technology 54:1232-1239. DOI: 10.1111/ijfs.14047.

Lücke F.-K. (2000) Utilization of microbes to process and preserve meat. Meat Science 56:105-115.

MacFaddin J.F. (2003) Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3 ed. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires.

Maijala R., Eerola S., Lievonen S., Hill P., Hirvi T. (1995) Formation of Biogenic Amines during Ripening of Dry Sausages as Affected by Starter Culture and Thawing Time of Raw Materials. Journal of Food Science 60:1187-1190. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1995.tb04552.x.

Maijala R.L., Eerola S.H., Aho M.A., Hirn J.A. (1993) The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat. Journal of Food Protection 56:125-129. DOI: 10.4315/0362-028X-56.2.125.

Mainar M.S., Stavropoulou D.A., Leroy F. (2017) Exploring the metabolic heterogeneity of coagulase-negative staphylococci to improve the quality and safety of fermented meats: A review. International Journal of Food Microbiology 247:24-37. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.021.

Manassi C.F., de Souza S.S., de Souza Hassemer G., Sartor S., Lima C.M.G., Miotto M., Lindner J.D.D., Rezzadori K., Pimentel T.C., Ramos G.L.d.P.A. (2022) Functional meat products: Trends in pro-, pre-, syn-, para-and post-biotic use. Food Research International 154:111035. DOI: 10.1016/j.foodres.2022.111035.

Mati M., Magala M., Karovičová J., Staruch L. (2015) The influence of Lactobacillus paracasei LPC-37 on selected properties of fermented sausages. Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences 9:58-65. DOI: 10.5219/430.

McLean N.W., Rosenstein I.J. (2000) Characterisation and selection of a Lactobacillus species to re-colonise the vagina of women with recurrent bacterial vaginosis. Journal of medical microbiology 49:543-552. DOI: 10.1099/0022-1317-49-6-543.

Mejri L., Vásquez-Villanueva R., Hassouna M., Marina M.L., García M.C. (2017) Identification of peptides with antioxidant and antihypertensive capacities by RP-HPLC-Q-TOF-MS in dry fermented camel sausages inoculated with different starter cultures and ripening times. Food Research International 100:708-716. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.07.072.

Metchnikoff E. (1908) The prolongation of life Putnam.

Milićević B., Tomović V., Danilović B., Savić D. (2021) The influence of starter cultures on the lactic acid bacteria microbiota of Petrovac sausage. Italian journal of food science 33:24-34. DOI: 10.15586/ijfs.v33i2.1918.

Molly K., Demeyer D., Johansson G., Raemaekers M., Ghistelinck M., Geenen I. (1997) The importance of meat enzymes in ripening and flavour generation in dry fermented sausages. First results of a European project. Food Chemistry 59:539-545. DOI: 10.1016/S0308-8146(97)00004-6.

Montel M.C. (1999) Fermented Meat Products, in: R. K. Robinson (Ed.), Encyclopedia of Food Microbiology, Elsevier, Oxford. pp. 744-753.

Moreno I., Marasca E.T.G., de Sá P.B.Z.R., de Souza Moitinho J., Marquezini M.G., Alves M.R.C., Bromberg R. (2018) Evaluation of probiotic potential of bacteriocinogenic lactic acid bacteria strains isolated from meat products. Probiotics and Antimicrobial Proteins 10:762-774. DOI: 10.1007%2Fs12602-018-9388-9.

Muguerza E., Ansorena D., Astiasarán I. (2003) Improvement of nutritional properties of Chorizo de Pamplona by replacement of pork backfat with soy oil. Meat Science 65:1361-1367.

Munekata P.E., Pateiro M., Domínguez R., Santos E.M., Lorenzo J.M. (2021a) Cruciferous vegetables as sources of nitrate in meat products. Current Opinion in Food Science 38:1-7.

Munekata P.E., Pateiro M., Tomasevic I., Domínguez R., da Silva Barretto A.C., Santos E.M., Lorenzo J.M. (2021b) Functional fermented meat products with probiotics—A review. Journal of Applied Microbiology. DOI: 10.1111/jam.15337.

Munekata P.E., Pateiro M., Tomasevic I., Domínguez R., da Silva Barretto A.C., Santos E.M., Lorenzo J.M. (2022) Functional fermented meat products with probiotics—A review. Journal of Applied Microbiology 133:91-103. DOI: 10.1111/jam.15337.

Murahashi T., Nagasawa M., Haga S., Hayashi T. (2020) Palatability and physicochemical properties of sausages prepared via lactic acid fermentation and drying at low temperature. Animal Science Journal 91:e13446. DOI: 10.1111/asj.13446.

Murray M., Thompson W. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8:4321-4326. DOI: 10.1093/nar/8.19.4321.

Muthukumarasamy P., Holley R.A. (2006) Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated Lactobacillus reuteri</i>. International Journal of Food Microbiology 111:164-169. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.036.

Narvhus J., Lassen J.F., Grahek-Ogden D., Eckner K.F., Kapperud G., Nesbakken T., Robertson L., Rosnes J.T., Skjerdal T., Skjerve E. (2016) Health risk assessment of a food supplement containing Lactobacillus reuteri Protectis®. Scientific Opinion of the Panel on biological hazards of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety. VKM Report.

Niinivaara F.P. (1955) Über den Einfluss von Bakterienreinkuturen auf die Reifung und Umrötung der Rohwurst.

Nurmi E. (1966) Effect of bacterial inoculations on characteristics and microbial flora of dry sausage.

Olesen P.T., Meyer A.S., Stahnke L.H. (2004) Generation of flavour compounds in fermented sausages—the influence of curing ingredients, Staphylococcus starter culture and ripening time. Meat Science 66:675-687. DOI: 10.1016/S0309-1740(03)00189-X.

Olivares A., Navarro J.L., Salvador A., Flores M. (2010) Sensory acceptability of slow fermented sausages based on fat content and ripening time. Meat Science 86:251-257. DOI: 10.1016/j.meatsci.2010.04.005.

Ordoñez J.A., Hierro E.M., Bruna J.M., de la Hoz L. (1999) Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. Crit Rev Food Sci Nutr 39:329-67. DOI: 10.1080/10408699991279204.

Ordóñez J.A., de la Hoz L. (2007) Mediterranean products. Handbook of fermented meat and poultry 32:333-347.

Ouwehand A.C., Salminen S., Isolauri E. (2002) Probiotics: an overview of beneficial effects, Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications: Proceedings of the seventh Symposium on lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications, 1–5 September 2002, Egmond aan Zee, the Netherlands, Springer. pp. 279-289.

Ouwehand A.C., DongLian C., Weijian X., Stewart M., Ni J., Stewart T., Miller L.E. (2014) Probiotics reduce symptoms of antibiotic use in a hospital setting: A randomized dose response study. Vaccine 32:458-463. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.11.053.

Palavecino Prpich N.Z., Camprubí G.E., Cayré M.E., Castro M.P. (2021) Indigenous Microbiota to Leverage Traditional Dry Sausage Production. International Journal of Food Science 2021:6696856. DOI: 10.1155/2021/6696856.

Pan X., Chen F., Wu T., Tang H., Zhao Z. (2009) The acid, bile tolerance and antimicrobial property of Lactobacillus acidophilus NIT. Food Control 20:598-602. DOI: 10.1016/j.foodcont.2008.08.019.

Papageorgiou M., Lambropoulou D., Morrison C., Kłodzińska E., Namieśnik J., Płotka-Wasylka J. (2018) Literature update of analytical methods for biogenic amines determination in food and beverages. TrAC Trends in Analytical Chemistry 98:128-142. DOI: 10.1016/j.trac.2017.11.001.

Papamanoli E., Kotzekidou P., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E. (2002) Characterization of Micrococcaceae isolated from dry fermented sausage. Food Microbiology 19:441-449. DOI: 10.1006/fmic.2002.0503.

Papamanoli E., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E., Kotzekidou P. (2003) Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. Meat Science 65:859-867. DOI: 10.1016/S0309-1740(02)00292-9.

Parthasarathy D.K., Bryan N.S. (2012) Sodium nitrite: The “cure” for nitric oxide insufficiency. Meat Science 92:274-279. DOI: 10.1016/j.meatsci.2012.03.001.

Pavli F.G., Argyri A.A., Chorianopoulos N.G., Nychas G.-J.E., Tassou C.C. (2020) Effect of Lactobacillus plantarum L125 strain with probiotic potential on physicochemical, microbiological and sensorial characteristics of dry-fermented sausages. LWT 118:108810. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.108810.

Pennacchia C., Vaughan E.E., Villani F. (2006) Potential probiotic Lactobacillus strains from fermented sausages: Further investigations on their probiotic properties. Meat Science 73:90-101.

Pennacchia C., Ercolini D., Blaiotta G., Pepe O., Mauriello G., Villani F. (2004) Selection of Lactobacillus strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. Meat Science 67:309-317.

Pérez-Alvarez J.Á., Fernández-López J. (2012) Chemical and biochemical aspects of color in muscle foods. Handbook of meat, poultry and seafood quality:1-24.

Perez-Burgos A., Wang L., McVey Neufeld K.-A., Mao Y.-K., Ahmadzai M., Janssen L.J., Stanisz A.M., Bienenstock J., Kunze W.A. (2015) The TRPV1 channel in rodents is a major target for antinociceptive effect of the probiotic Lactobacillus reuteri DSM 17938. The Journal of Physiology 593:3943-3957.

Pérez-Burillo S., Mehta T., Pastoriza S., Kramer D.L., Paliy O., Rufián-Henares J.Á. (2019) Potential probiotic salami with dietary fiber modulates antioxidant capacity, short chain fatty acid production and gut microbiota community structure. LWT 105:355-362. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.02.006.

Pidcock K., Heard G.M., Henriksson A. (2002) Application of nontraditional meat starter cultures in production of Hungarian salami. International Journal of Food Microbiology 76:75-81. DOI: 10.1016/S0168-1605(02)00002-8.

Plaza-Diaz J., Ruiz-Ojeda F.J., Gil-Campos M., Gil A. (2019) Mechanisms of action of probiotics. Advances in nutrition 10:S49-S66. DOI: 10.1093/advances/nmy063.

Radulović Z., Živković D., Mirković N., Petrušić M., Stajić S., Perunović M., Paunović D. (2011) Effect of probiotic bacteria on chemical composition and sensory quality of fermented sausages. Procedia Food Science 1:1516-1522. DOI: doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.224.

Ravyts F., Steen L., Goemaere O., Paelinck H., De Vuyst L., Leroy F. (2010) The application of staphylococci with flavour-generating potential is affected by

acidification in fermented dry sausages. Food Microbiology 27:945-954. DOI: 10.1016/j.fm.2010.05.030.

Rebucci R., Sangalli L., Fava M., Bersani C., Cantoni C., Baldi A. (2007) Evaluation of functional aspects in Lactobacillus strains isolated from dry fermented sausages. Journal of food quality 30:187-201. DOI: 10.1111/j.1745-4557.2007.00114.x.

Robertson L.J., Sprong H., Ortega Y.R., van der Giessen J.W., Fayer R. (2014) Impacts of globalisation on foodborne parasites. Trends in parasitology 30:37-52.

Rodríguez Haro I., Salazar Castillo M., Villalobos Infante E. (2012) Lactobacillus spp. del tracto intestinal de Gallus gallus con potencial probiótico. REBIOL 32:62-72.

Romani Vestman N., Chen T., Lif Holgerson P., Öhman C., Johansson I. (2015) Oral Microbiota Shift after 12-Week Supplementation with Lactobacillus reuteri DSM 17938 and PTA 5289; A Randomized Control Trial. PLoS ONE 10:e0125812.

Roselino M.N., Maciel L.F., Sirocchi V., Caviglia M., Sagratini G., Vittori S., Taranto M.P., Cavallini D.C.U. (2020) Analysis of biogenic amines in probiotic and commercial salamis. Journal of Food Composition and Analysis 94:103649. DOI: 10.1016/j.jfca.2020.103649.

Rosenstein I.J., Fontaine E.A., Morgan D.J., Sheehan M., Lamont R.F., Taylor-Robinson D. (1997) Relationship between hydrogen peroxide-producing strains of lactobacilli and vaginosis-associated bacterial species in pregnant women. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 16:517-522. DOI: DOI:10.1007/BF01708235.

Rosmini M.R., Frizzo L.S., Zogbi A.P. (2008) Meat products with low sodium content: Processing and properties, in: L. F. Juana (Ed.), Technological Strategies for Functional Meat Products Development, Transworld Research Network, Kerala. pp. 87-108.

Rubio R., Jofré A., Martín B., Aymerich T., Garriga M. (2014) Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. Food Microbiology 38:303-311. DOI: 10.1016/j.fm.2013.07.015.

Rubio R., Aymerich T., Bover-Cid S., Guàrdia M.D., Arnau J., Garriga M. (2013) Probiotic strains Lactobacillus plantarum 299V and Lactobacillus rhamnosus GG as starter cultures for fermented sausages. LWT-Food Science and Technology 54:51-56. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.05.014.

Ruiz-Moyano S., Martín A., Benito M.J., Nevado F.P., de Guía Córdoba M. (2008) Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. Meat Science 80:715-721. DOI: 10.1016/j.meatsci.2008.03.011.

Ruiz-Moyano S., Martín A., Benito M.J., Casquete R., Serradilla M.J., Córdoba M.d.G. (2009) Safety and functional aspects of pre-selected lactobacilli for probiotic use in Iberian dry-fermented sausages. Meat Science 83:460-467. DOI: 10.1016/j.meatsci.2009.06.027.

Ruiz-Moyano S., Martín A., Benito M.J., Hernández A., Casquete R., de Guia Córdoba M. (2011) Application of Lactobacillus fermentum HL57 and Pediococcus acidilactici SP979 as potential probiotics in the manufacture of traditional Iberian dry-fermented sausages. Food Microbiology 28:839-847. DOI: 10.1016/j.fm.2011.01.006.

Ruiz J., Pérez-Palacios T. (2014) Ingredients. Handbook of fermented meat and poultry:55-67.

Rust R.E. (2007) US products. Handbook of fermented meat and poultry:301-306.

Sakai T., Makino H., Ishikawa E., Oishi K., Kushiro A. (2011) Fermented milk containing Lactobacillus casei strain Shirota reduces incidence of hard or lumpy stools in

healthy population. International journal of food sciences and nutrition 62:423-430. DOI: 10.3109/09637486.2010.542408.

Sallan S., Yılmaz Oral Z.F., Kaya M. (2023) A review on the role of lactic acid bacteria in the formation and reduction of volatile nitrosamines in fermented sausages. Foods 12:702. DOI: doi.org/10.3390/foods12040702.

Samelis J., Metaxopoulos J., Vlassi M., Pappa A. (1998) Stability and safety of traditional Greek salami—a microbiological ecology study. International Journal of Food Microbiology 44:69-82. DOI: 10.1016/S0168-1605(98)00124-X.

Sameshima T., Magome C., Takeshita K., Arihara K., Itoh M., Kondo Y. (1998) Effect of intestinal Lactobacillus starter cultures on the behaviour of Staphylococcus aureus in fermented sausage. International Journal of Food Microbiology 41:1-7. DOI: 10.1016/S0168-1605(98)00038-5.

Savino F., Garro M., Montanari P., Galliano I., Bergallo M. (2018) Crying Time and RORγ/FOXP3 Expression in Lactobacillus reuteri DSM17938-Treated Infants with Colic: A Randomized Trial. The Journal of Pediatrics 192:171-177.e1. DOI: 10.1016/j.jpeds.2017.08.062.

Sayas-Barberá E., Viuda-Martos M., Fernández-López F., Pérez-Alvarez J.A., Sendra E. (2012) Combined use of a probiotic culture and citrus fiber in a traditional sausage 'Longaniza de Pascua'. Food Control 27:343-350. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.04.009.

Schillinger U., Lücke F.-K. (1987) Identification of lactobacilli from meat and meat products. Food Microbiology 4:199-208. DOI: 10.1016/0740-0020(87)90002-5.

Sidira M., Galanis A., Nikolaou A., Kanellaki M., Kourkoutas Y. (2014) Evaluation of Lactobacillus casei ATCC 393 protective effect against spoilage of probiotic dry-fermented sausages. Food Control 42:315-320. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.02.024.

Sirini N., Frizzo L.S., Aleu G., Soto L.P., Rosmini M.R. (2021) Use of probiotic microorganisms in the formulation of healthy meat products. Current Opinion in Food Science 38:141-146. DOI: 10.1016/j.cofs.2020.11.007.

Sirini N., Lucas-González R., Fernández-López J., Viuda-Martos M., Pérez-Álvarez J., Signorini M. (2022a) Effect of probiotic Lactiplantibacillus plantarum and chestnut flour (Castanea sativa mill) on microbiological and physicochemical characteristics of dry-cured sausages during storage. Meat Science 184:108691. DOI: 10.1016/j.meatsci.2021.108691.

Sirini N., Munekata P.E., Lorenzo J.M., Stegmayer M.Á., Pateiro M., Pérez-Álvarez J.Á., Sepúlveda N., Sosa-Morales M.E., Teixeira A., Fernández-López J. (2022b) Development of healthier and functional dry fermented Sausages: Present and future. Foods 11:1128. DOI: 10.3390/foods11081128.

Sirini N., Stegmayer M., Ruiz M.J., Cuffia F., Rossler E., Otero J., Soto L., Lorenzo J.M., Pérez-Álvarez J.Á., Rosmini M. (2023) Applicability of the probiotic Lactiplantibacillus plantarum BFL as an adjunct culture in a dry fermented sausage. Meat Science 200:109166. DOI: 10.1016/j.meatsci.2023.109166.

Slima S.B., Ktari N., Triki M., Trabelsi I., Abdeslam A., Moussa H., Makni I., Herrero A.M., Jiménez-Colmenero F., Ruiz-Capillas C. (2018) Effects of probiotic strains, Lactobacillus plantarum TN8 and Pediococcus acidilactici, on microbiological and physico-chemical characteristics of beef sausages. LWT 92:195-203. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.02.038.

Soto L.P., Frizzo L.S., Bertozzi E., Avataneo E., Sequeira G.J., Rosmini M.R. (2010) Molecular microbial analysis of Lactobacillus strains isolated from the gut of calves

for potential probiotic use. Veterinary medicine international 2010. DOI: 10.4061/2010/274987.

Spotti E., Berni E. (2007) Starter cultures: molds. Handbook of fermented meat and poultry:171-176.

Stadnik J., J Dolatowski Z. (2010) Biogenic amines in meat and fermented meat products. Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria 9:251-263.

Stavropoulou E., Bezirtzoglou E. (2020) Probiotics in Medicine: A Long Debate. Frontiers in Immunology 11. DOI: 10.3389/fimmu.2020.02192.

Stegmayer M.Á., Sirini N.E., Ruiz M.J., Soto L.P., Zbrun M.V., Lorenzo J.M., Signorini M.L., Frizzo L.S. (2023) Effects of lactic acid bacteria and coagulase-negative staphylococci on dry-fermented sausage quality and safety: Systematic review and meta-analysis. Meat Science:109337. DOI: 10.1016/j.meatsci.2023.109337.

Summo C., Caponio F., Paradiso V.M., Pasqualone A., Gomes T. (2010) Vacuum-packed ripened sausages: Evolution of oxidative and hydrolytic degradation of lipid fraction during long-term storage and influence on the sensory properties. Meat Science 84:147-151. DOI: 10.1016/j.meatsci.2009.08.041.

Tabanelli G., Coloretti F., Chiavari C., Grazia L., Lanciotti R., Gardini F. (2012) Effects of starter cultures and fermentation climate on the properties of two types of typical Italian dry fermented sausages produced under industrial conditions. Food Control 26:416-426. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.01.049.

Tagg J.R., McGiven A.R. (1971) Assay system for bacteriocins. Appl Microbiol 21:943.

Talon R., Walter D., Montel M.C. (2000) Growth and effect of staphylococci and lactic acid bacteria on unsaturated free fatty acids. Meat Science 54:41-47. DOI: 10.1016/S0309-1740(99)00068-6.

Tharmaraj N., Shah N. (2003) Selective enumeration of Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus, Streptococcus thermophilus, Lactobacillus acidophilus, bifidobacteria, Lactobacillus casei, Lactobacillus rhamnosus, and propionibacteria. Journal of Dairy Science 86:2288-2296.

Thijssen A.Y., Clemens C.H., Vankerckhoven V., Goossens H., Jonkers D.M., Masclee A.A. (2016) Efficacy of Lactobacillus casei Shirota for patients with irritable bowel syndrome. European journal of gastroenterology & hepatology 28:8-14.

Tremonte P., Reale A., Di Renzo T., Tipaldi L., Di Luccia A., Coppola R., Sorrentino E., Succi M. (2010) Interactions between Lactobacillus sakei and CNC (Staphylococcus xylosus and Kocuria varians) and their influence on proteolytic activity. Letters in Applied Microbiology 51:586-594. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2010.02939.x.

Tripolt N.J., Leber B., Triebl A., Kofeler H., Stadlbauer V., Sourij H. (2015) Effect of Lactobacillus casei Shirota supplementation on trimethylamine-N-oxide levels in patients with metabolic syndrome: An open-label, randomized study. Atherosclerosis 242:141-4. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.05.005.

Vale G.C., Mayer M.P.A. (2021) Effect of probiotic Lactobacillus rhamnosus by-products on gingival epithelial cells challenged with Porphyromonas gingivalis. Archives of Oral Biology 128:105174. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2021.105174.

Vidal-Carou M.C., Veciana-Nogués M.T., Latorre-Moratalla M.L., Bover-Cid S. (2014) Biogenic amines: risks and control. Handbook of fermented meat and poultry:413-428. DOI: 10.1002/9781118522653.ch47.

Vignolo G., Fadda S. (2007) Starter cultures: Bioprotective cultures. Handbook of fermented meat and poultry:147-157.

Vignolo G., Fontana C., Fadda S. (2010) Semidry and dry fermented sausages. Handbook of meat processing 561:379-398. DOI: 10.1002/9780813820897.ch22.

Virtanen H.E., Voutilainen S., Koskinen T.T., Mursu J., Kokko P., Ylilauri M.P., Tuomainen T.-P., Salonen J.T., Virtanen J.K. (2019) Dietary proteins and protein sources and risk of death: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. The American journal of clinical nutrition 109:1462-1471. DOI: 10.1093/ajcn/nqz025.

WHO. (2020a) Cancer: carcinogenicity of the consumption of red meat and processed meat, WHO Geneva.

WHO. (2020b) Healthy diet, World Health Organization. Regional Office for the Eastern Mediterranean.

WHO. (2020c) Salt reduction and iodine fortification strategies in public health: report of a joint technical meeting convened by the World Health Organization and The George Institute for Global Health in collaboration with the International Council for the Control of Iodine Deficiency Disorders Global Network, Sydney, Australia, March 2013 World Health Organization.

Wolf G., Arendt E.K., Pfähler U., Hammes W.P. (1990) Heme-dependent and heme-independent nitrite reduction by lactic acid bacteria results in different N-containing products. International Journal of Food Microbiology 10:323-329. DOI: 10.1016/0168-1605(90)90079-K.

Wong-Villarreal A., Corzo-González H., Hernández-Núñez E., González-Sánchez A., Giacomán-Vallejos G. (2021) Caracterización de bacterias ácido lácticas con actividad antimicrobiana aisladas del queso crema de Chiapas, México. CienciaUAT 15:144-155.

Xu M., Wang J., Wang N., Sun F., Wang L., Liu X.-H. (2015) The Efficacy and Safety of the Probiotic Bacterium Lactobacillus reuteri DSM 17938 for Infantile Colic: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. PLoS ONE 10:e0141445.

Yin L., Canchaya C., Fang F., Raftis E., Ryan K.A., van Pijkeren J.-P., van Sinderen D., O'Toole P.W. (2007) Distribution of megaplasmids in Lactobacillus salivarius and other lactobacilli. Journal of bacteriology 189:6128-6139. DOI: 10.1128/JB.00447-07.

Yu D., Feng M.-q., Sun J. (2021) Influence of mixed starters on the degradation of proteins and the formation of peptides with antioxidant activities in dry fermented sausages. Food Control 123:107743. DOI: 10.1016/j.foodcont.2020.107743.

Zagorec M., Champomier-Vergès M.-C. (2017) Lactobacillus sakei: a starter for sausage fermentation, a protective culture for meat products. Microorganisms 5:56. DOI: 10.3390/microorganisms5030056.

Zdolec N. (2017) Fermented meat products: health aspects CRC Press.

Zhang W., Xiao S., Samaraweera H., Lee E.J., Ahn D.U. (2010) Improving functional value of meat products. Meat Science 86:15-31. DOI: 10.1016/j.meatsci.2010.04.018.

Zhang Y., Hou Y., Zhang S., Jing N., Zhang H., Xie Y., Liu H., Yan J., Ren J., Jin J. (2023) Bifidobacterium animalis A12, a probiotic strain that promotes glucose and lipid metabolism, improved the texture and aroma of the fermented sausage. Foods 12:336. DOI: 10.3390/foods12020336.

Zhu Y., Guo L., Yang Q. (2020) Partial replacement of nitrite with a novel probiotic Lactobacillus plantarum on nitrate, color, biogenic amines and gel properties of Chinese fermented sausages. Food Research International 137:109351. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109351.

Zogbi A.P. (2005) Evaluación objetiva de los parámetros de color en pastas de carne bovina, utilizadas para la elaboración de embutidos crudo-curados. . Tesis de Maestría en Tecnología de los Alimentos. Córdoba, Argentina. Universidad Católica de Córdoba.

Zommiti M., Cambronel M., Maillot O., Barreau M., Sebei K., Feuilloley M., Ferchichi M., Connil N. (2018) Evaluation of probiotic properties and safety of Enterococcus faecium isolated from artisanal Tunisian meat “Dried Ossban”. Frontiers in Microbiology 9:1685. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01685.

Žugić Petrović T., Ilić P., Grujović M., Mladenović K., Stanisavljević D., Čomić L. (2019) Dry-fermented sausage as probiotic carrier food. Fleischwirtschaft.

Zukál E., Incze K. (2010) Drying. Handbook of meat processing:219-229.

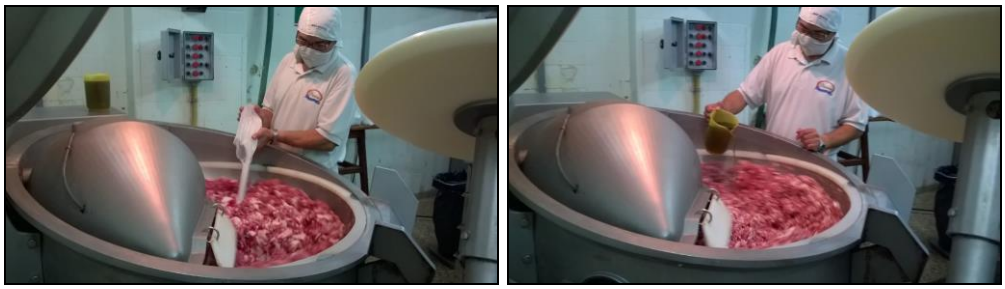
CAPÍTULO VII. ANEXOS.

Anexo VII.1. Elaboración de productos y mediciones.

1. Preparación del inóculo *L. rhamnosus* Lr-32.

2. Medición de concentración de *L. rhamnosus* Lr-32 y cultivo iniciador comercial Bactoferm F1-100, Hansen®.

3. Control de materia prima.



4. Preparación del pastón.

5. Inoculación *L. rhamnosus* Lr-32.

6. Embutido de pastones y atado manual.

7. Inoculación de MOLD-600, Hansen®.

8. Identificación de lotes.

9. Secadero automatizado. Etapas de estufado y secado/maduración.

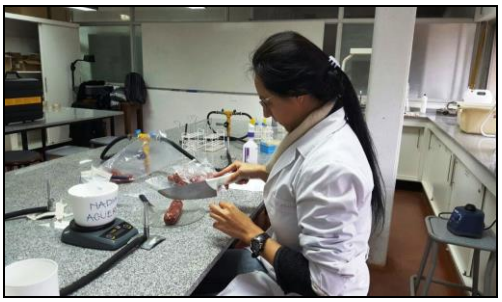
10. Pelado, envasado al vacío y conservación.

Anexo VII.2. Determinaciones fisicoquímicas.

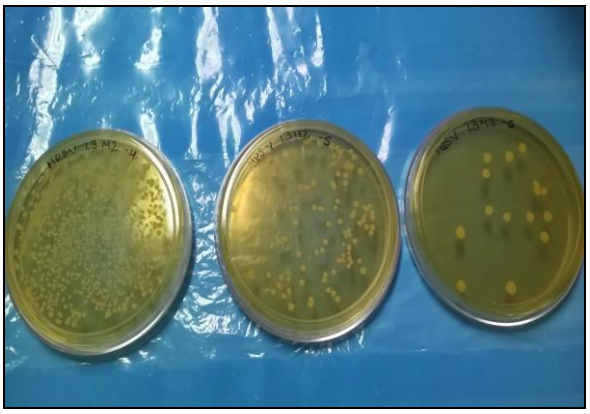
1. Determinación de temperatura, humedad, merma y pH.

2. Medición de coordenadas de color L*a*b*.

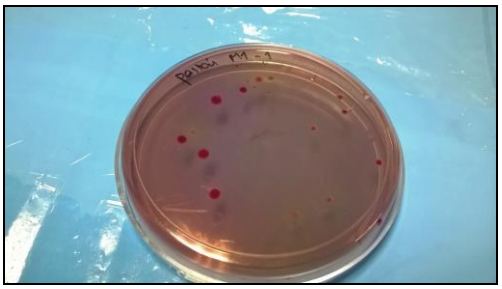
Anexo VII.3. Determinaciones microbiológicas.



1. Preparación de muestras para el análisis.



2. Siembra e incubación anaeróbica en MRSV a 43°C.



3. Siembra e incubación aeróbica en MSA, MRS y VRBGA.

Anexo VII.4. Panel sensorial.

Planilla Análisis Sensorial Panel de Consumidores Entrenados			
Fecha de elaboración:		Fecha de estudio:	
Panelista:		N° Muestra:	

I) OLOR

A- OFF ODOUR Olor difiere del típico		
1	Ausente	
2	Débil	
3	Evidente	
4	Intenso	
5	Muy intenso	

II) Aceptabilidad

A- Aceptabilidad general: escala hedónica		
1	Muy agradable	
2	Agradable	
3	Ni agradable/ni desagradable	
4	Desagradable	
5	Muy desagradable	

III) Aspecto:

A- Color curado: Intensidad del color curado		
1	Color rosa (carne cerdo)	
2	Color rojo (carne bovina)	
3	Color rojo-bordo (jamón crudo)	
4	Color rojo-amarronado(ciervo)	
5	Color negruzco (morcilla)	

B- Núcleo pálido: Puntuación de la decoloración central		
1	Imperceptible (uniforme)	
2	Ligeramente evidente	
3	Poco evidente (mezcla)	
4	Evidente	
5	Muy evidente (dos tonos)	

C -Humedad: al tacto al pasar el dedo índice sobre la feta		
1	Acuoso (sandia)	
2	Suculento (carne cruda)	
3	Jugoso (naranja)	
4	Húmedo (manzana)	
5	Seco (galleta)	

D-Cohesión: Unión magro-grasa:		
1	Muy firme (mortadela)	
2	Ligeramente firme	
3	Poco firme (chorizo fresco)	
4	Se desgrana	
5	Nulo (carne molida)	

E- Marmoleado: Proporción magro-grasa		
1	Mucha grasa (30/70%)	
2	Más grasa (40/60%)	
3	Equilibrado (50/50%)	
4	Más magro (60/40%)	
5	Mucho magro (70/30)	

IV) FLAVOR

A- SALINIDAD: de sabor básico por NaCl		
1	Ausente	
2	Débil	
3	Evidente	
4	Intenso	
5	Muy intenso	

B- ACIDEZ: sensación de sabor cítrico		
1	Ausente	
2	Débil	
3	Evidente	
4	Intenso	
5	Muy intenso	

C- METÁLICO: sensación de sabor básico provocado por el metal (sangre)		
1	Ausente	
2	Débil	
3	Evidente	
4	Intenso	
5	Muy intenso	

D- PICOR: sensación de ardor en la boca y garganta		
1	Ausente	
2	Débil	
3	Evidente	
4	Intenso	
5	Muy intenso	

E- SABOR MADURADO: sabor de los embutidos fermentados		
1	Imperceptible (fiambre pollo)	
2	Ligero	
3	Modesto (mortadela)	
4	Intenso	
5	Muy intenso (jamón crudo)	

III TEXTURA

A- DUREZA: fuerza para morder a través de la muestra entre los incisivos		
1	Blando (queso untable)	
2	Ligeramente blando (queso barra)	
3	Firme (aceituna)	
4	Ligeramente duro (galletita)	
5	Muy duro (caramelo cristal)	

B- MASTICABILIDAD: número de masticaciones necesarias para deglutir		
1	Tierno (arveja tierna)	
2	Ligeramente masticable (viena)	
3	Masticable (caramelo masticable)	
4	Liger. correoso (manzana c/cáscara)	
5	Correoso (panceta)	

C- GOMOSIDAD: Esfuerzo necesario para reducir un producto y deglutirlo		
1	Arenoso (manzana arenosa)	
2	Harinoso (alfajor maicena)	
3	Pastoso (puré de papas)	
4	Gomoso (gelatina)	
5	Muy gomoso (formitas)	

D- FLUIDEZ DE LA GRASA: fluidez de la grasa durante la masticación		
1	Aceitoso (aceite de oliva)	
2	Ligeramente grasoso	
3	Grasoso (mortadela)	
4	Ligeramente seboso	
5	Seboso (pasta de maní)	

OBSERVACIONES:

M N°:

Fuente: Aleu, *et al*. (2014).

1. Planilla sensorial.

Sexo: F M Edad:

Indique cuántas veces al mes consume salame, marque con una cruz "X"									
Nunca		Menos de 1 vez al mes		Una vez al mes		Entre 2 y 4 veces al mes		Más de 4 veces al mes	

Coloque el número de muestra en la primera casilla e indique su opinión acerca de colocando una cruz "X" en el casillero

	Muy agradable	Agradable	Ni agradable Ni desagradable	Desagradable	Muy desagradable
	Muy agradable	Agradable	Ni agradable Ni desagradable	Desagradable	Muy desagradable
	Muy agradable	Agradable	Ni agradable Ni desagradable	Desagradable	Muy desagradable

COMENTARIOS:

¡Muchas gracias!

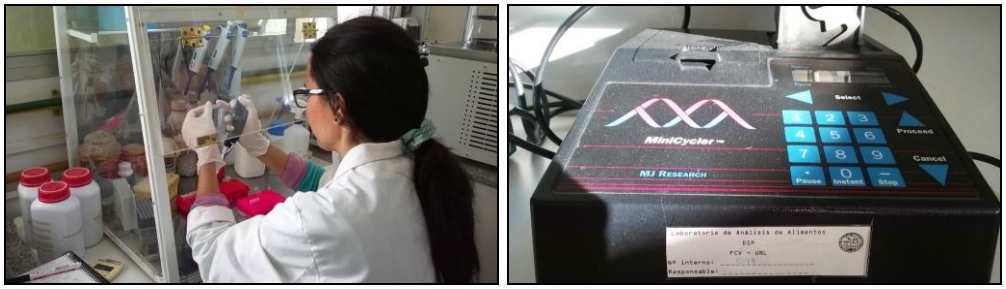
Fuente: Aleu, *et al*. (2014).

2. Modelo de planilla afectiva- prueba de aceptabilidad de salames.

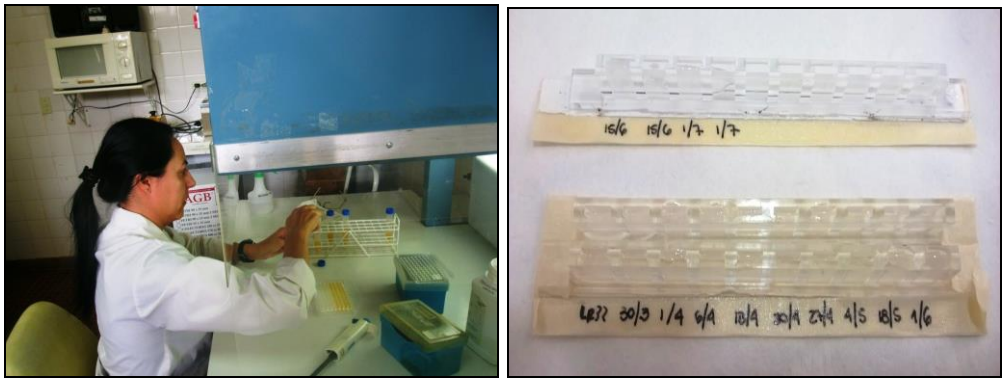
3. Preparación de muestras análisis sensorial.

4. Evaluación sensorial afectiva.

Anexo VII.5. Identificación molecular.

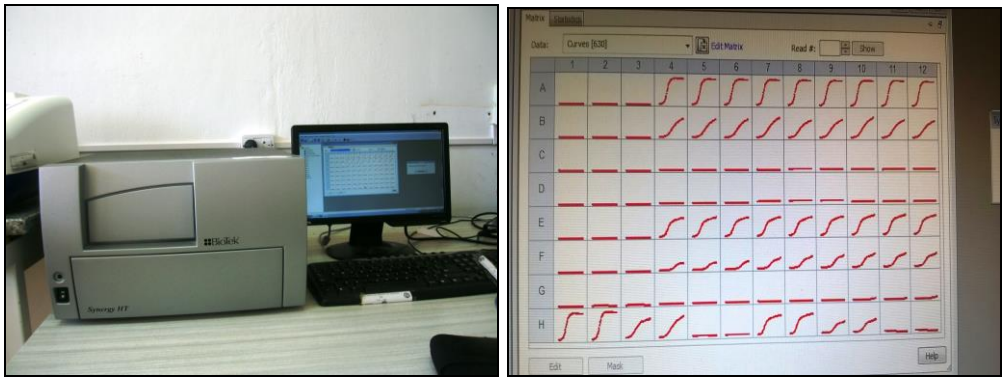


1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).



2. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).

Anexo VII.6. Pruebas probióticos.



1. Medición del crecimiento de cepas a una longitud de onda de 620 nm (DO_{620}).