

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**Departamento de Nutrición y Bromatología III**  
**(Higiene y Tecnología de los Alimentos)**



**EFFECTO DE LA ADICIÓN DE PROTEASAS EN EL  
PROCESO MADURATIVO DE LOS EMBUTIDOS  
CRUDOS CURADOS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Manuela Fernández Álvarez**

Bajo la dirección de los doctores

**Juan Antonio Ordóñez Pereda**  
**Lorenzo de la Hoz Perales**

**Madrid, 2002**

18

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA III  
(HIGIENE Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS)

**EFFECTO DE LA ADICION DE LIPASA PANCREATICA  
EN LA MADURACION DE EMBUTIDOS CRUDOS CURADOS**

Memoria que para optar al grado de  
Doctor en Veterinaria presenta la  
Licenciada Manuela Fernández Alvarez.

Madrid, enero de 1994.



TELF. 34 - (9) 1 - 394 37 49

FAX: 34 - (9) 1 - 394 37 43

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DPTO. DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA III  
(HIGIENE Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS)

CIUDAD UNIVERSITARIA  
28040 MADRID

JUAN ANTONIO ORDOÑEZ PEREDA, CATEDRATICO DE TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS, Y LORENZO DE LA HOZ PERALES, PROFESOR TITULAR DE TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada **"Efecto de la adición de lipasa pancreática en la maduración de embutidos crudos curados"**, de la que es autora la Licenciada en Veterinaria D<sup>a</sup> Manuela Fernández Alvarez, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición y Bromatología III (Higiene y Tecnología de los Alimentos) bajo la dirección conjunta de los que suscriben y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor en Veterinaria.

Madrid, 14 de enero de 1994

Fdo.: Juan A. Ordóñez Pereda

Fdo.: Lorenzo de la Hoz Perales

*A mi familia*  
*A mis amigos*

## AGRADECIMIENTOS:

Al Profesor Dr. Bernabé Sanz Pérez, por su cálida acogida en el Departamento que dirigía en el momento de mi incorporación al mismo.

Deseo expresar mi gratitud al Profesor Dr. Juan Antonio Ordóñez Pereda, actual director del Departamento de Nutrición y Bromatología III, por la dirección de esta tesis y por haberme iniciado en el campo de la investigación. Igualmente al Profesor Dr. Lorenzo de la Hoz Perales, codirector de este trabajo, por su paciente asistencia y supervisión desde mis primeros pasos por un laboratorio. Gracias a ambos por su trato cordial, sus orientaciones y consejos, que han sido decisivos en mi formación.

A la Profesora Dra. M<sup>a</sup> Isabel Cambero por su cariñosa ayuda y los ánimos que siempre me ha dado. A los Profesores Dres. Gonzalo García de Fernando, M<sup>a</sup> Luisa García y M<sup>a</sup> Dolores Selgas por su constante apoyo y su buena disposición a ayudarme siempre que lo necesité y por las agradables charlas mantenidas a lo largo de estos años.

Quiero agradecer también a los restantes miembros (profesores y becarios) del Departamento de Nutrición y Bromatología III el apoyo y compañerismo demostrados durante tantas horas.

A Olga, compañera de fatigas en el laboratorio desde nuestros inicios. A Angel, por su afecto y los buenos ratos compartidos. A María por sus detalles.

Gracias a Odón por sus utilísimos consejos y su "aplastante" sinceridad; a Daniel, por compartir mis problemas; a Isabel, por sus innumerables y divertidos "puntitos"; a Gemma, por su desinteresada ayuda; a

Ana, por darme su confianza y a Seve ("becario integrado"), por estar a mi lado. A todos, por vuestro cariño y amistad.

Al Dr. José María Monfort, director del I.R.T.A. de Monells (Gerona) por permitirme realizar los análisis de los compuestos carbonilo por HPLC en dicho centro. A los Dres. Juan Antonio García-Regueiro e Isabel Díaz, mis más sinceras gracias por su ayuda y por hacer tan agradable mi estancia allí.

A Industrias Cárnicas Cabo, S.A. por cedernos generosamente sus instalaciones y las materia primas para la elaboración de los embutidos necesarios para la realización de esta tesis.

A la Consejería de Educación de la Comunidad Autónoma de Madrid, por la concesión de una Beca de Formación de Personal Investigador para la realización de esta tesis. También quiero agradecer a la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) la financiación de este trabajo, incluido en el Proyecto de Investigación ALI88/0005.

Al resto de mis amigos "extradepartamentales", por su apoyo incondicional y su comprensión. En especial a Luis, por ser como es.

Por último, quiero agradecer a mis padres, a mi hermana, a Julio y a Alicia su cariño y su confianza en mí, fundamentales para la realización de este trabajo.

## INDICE

	<b>Página</b>
<b>I.- INTRODUCCION</b> .....	1
<b>I.1.- Generalidades</b> .....	2
<b>I.2.- Proceso de elaboración de los embutidos</b>	
<b>crudos curados</b> .....	4
<b>I.2.1.- Mezcla de los ingredientes</b> .....	4
I.2.1.1.- Ingredientes .....	5
I.2.1.1.1.- Carne .....	5
I.2.1.1.2.- Grasa .....	5
I.2.1.1.3.- Agentes del curado .....	5
I.2.1.1.4.- Especias y condimentos.....	6
I.2.1.1.5.- Aditivos.....	7
I.2.1.2.- Formación de la masa original .....	10
<b>I.2.2.- Fermentación</b> .....	11
<b>I.2.3.- Maduración o secado</b> .....	12
<b>I.3.- Factores que influyen en la calidad de los</b>	
<b>embutidos crudos curados</b> .....	13
<b>I.4.- Cambios que ocurren durante la maduración</b>	
<b>de los embutidos crudos curados</b> .....	14
<b>I.4.1.- Cambios microbiológicos</b> .....	15
<b>I.4.2.- Evolución del pH</b> .....	19
<b>I.4.3.- Desarrollo del color</b> .....	22
<b>I.4.4.- Deshidratación</b> .....	25
<b>I.4.5.- Desarrollo del sabor y aroma</b> .....	28
I.4.5.1.- Compuestos volátiles de los embutidos .....	31
I.4.5.2.- Glicolisis .....	39
I.4.5.3.- Proteolisis .....	41
I.4.5.4.- Degradación lipídica .....	42
I.4.5.4.1.- Fenómenos hidrolíticos .....	44

I.4.5.4.2.- Fenómenos oxidativos .....	50
<b>I.5.- Recientes avances en la tecnología de fabricación de los embutidos crudos curados .....</b>	<b>62</b>
<b>I.6.- Justificación del trabajo .....</b>	<b>68</b>
<b>II.- MATERIAL Y METODOS .....</b>	<b>79</b>
<b>II.1.- Material general .....</b>	<b>80</b>
II.1.1.- Material biológico .....	80
II.1.2.- Material general de laboratorio .....	80
<b>II.2.- Productos químicos .....</b>	<b>83</b>
II.2.1.- Reactivos .....	83
II.2.2.- Disolventes y purificación de los mismos....	84
II.2.3.- Soportes cromatográficos .....	85
II.2.3.1.- Cromatografía en capa fina .....	85
II.2.3.2.- Cromatografía en fase gaseosa .....	85
II.2.3.3.- Cromatografía líquida de alta eficacia ..	85
II.2.4.- Patrones .....	86
II.2.5.- Gases .....	86
<b>II.3.- Metodología .....</b>	<b>86</b>
<b>II.3.1.- Procedencia de las muestras .....</b>	<b>86</b>
II.3.1.1.- Composición de los embutidos .....	87
II.3.1.2.- Fabricación de los embutidos .....	87
II.3.1.3.- Toma de muestras.....	89
<b>II.3.2.- Métodos microbiológicos .....</b>	<b>91</b>
II.3.2.1.- Preparación de las muestras .....	91
II.3.2.2.- Medios de cultivo utilizados .....	91
II.3.2.3.- Realización de los recuentos .....	91

<b>II.3.3.- Métodos físicos, químicos y sensoriales.....</b>	<b>92</b>
II.3.3.1.- Determinación del contenido de humedad .....	92
II.3.3.2.- Determinación de la actividad de agua..	93
II.3.3.3.- Medida del pH .....	93
II.3.3.4.- Extracción y determinación del contenido de grasa.....	93
II.3.3.5.- Fraccionamiento de los lípidos por cromatografía en capa fina .....	95
II.3.3.6.- Análisis de la fracción de ácidos grasos libres .....	97
II.3.3.7.- Análisis de la fracción de ácidos grasos volátiles .....	106
II.3.3.8.- Análisis de los aldehídos volátiles.....	110
II.3.3.9.- Análisis sensorial .....	115

### **III.- RESULTADOS Y DISCUSION ..... 117**

<b>III.1.- Evolución de la flora microbiana .....</b>	<b>118</b>
<b>III.2.- Evolución del contenido de humedad .....</b>	<b>120</b>
<b>III.3.- Evolución de la actividad de agua .....</b>	<b>124</b>
<b>III.4.- Evolución del pH .....</b>	<b>126</b>
<b>III.5.- Evolución del contenido lipídico total .....</b>	<b>128</b>
<b>III.6.- Fraccionamiento de los lípidos totales por                     cromatografía en capa fina .....</b>	<b>134</b>
<b>III.7.- Composición de ácidos grasos de la fracción                     ácidos grasos libres.....</b>	<b>154</b>
<b>III.8.- Composición de ácidos grasos de la fracción                     ácidos grasos de cadena corta.....</b>	<b>173</b>
<b>III.9.- Evolución de los compuestos monocarbonilos.....</b>	<b>184</b>

<b>III.10.-Análisis sensorial.....</b>	<b>192</b>
<b>IV.- DISCUSION GENERAL .....</b>	<b>201</b>
<b>V.- CONCLUSIONES .....</b>	<b>207</b>
<b>VI.- BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>210</b>

---

*CAPITULO I*  
*INTRODUCCION*

---

## **I.1.- GENERALIDADES**

La Orden Ministerial de 7 de febrero de 1980 (B.O.E. de 21 de marzo de 1980) establece la "Norma de calidad para los productos cárnicos embutidos crudos-curados en el mercado interior". Dicha norma define al salchichón como "la mezcla de carnes picadas de cerdo, vacuno o de cerdo y vacuno y tocino y/o grasa de cerdo, adicionada de sal, especias y aditivos, amasada y embutida en tripas naturales o artificiales, en su caso, que ha sufrido un proceso de maduración-desección que le asegura una buena estabilidad, así como un olor y sabor característicos". Definiciones similares a ésta se recogen en la citada norma para los demás embutidos crudos curados: chorizo, salami y lomo embuchado.

Probablemente el curado de la carne surgió de forma casual como un método para su conservación mediante la adición de sal. Parece que la elaboración de embutidos se inició unos 1.500 años a. C., al observarse que la vida útil de la carne se prolongaba notablemente si, después de picarla finamente se mezclaba con sal y hierbas aromáticas y se desecaba tras su embutido (Palumbo y Smith, 1977), lo que proporcionaba además un producto muy apreciado por su agradable sabor. Según Pederson (1980) los embutidos crudos curados tuvieron probablemente su origen en el área mediterránea, cuya climatología era y es muy favorable para su maduración. La primera referencia documental se encuentra en el libro XVIII de "La Odisea", escrita por Homero 900 años a. C., en la que se habla de "tripas de cabra rellenas con sangre y grasa" (Liepe, 1982), si bien tales embutidos difieren bastante de los actuales. Los romanos heredaron de los griegos, y perfeccionaron, las técnicas de preparación de este tipo de alimentos, a los que se fueron incorporando otros ingredientes. Desde entonces, estos productos se han diversificado y extendido por todo el mundo.

Hoy en día, la importancia del curado como método de conservación de

la carne ha disminuido como consecuencia del desarrollo de otros sistemas (los tratamientos térmicos, la refrigeración y la congelación), pero en cambio, según Guerrero (1993), han adquirido mayor importancia otros aspectos del proceso de curado como son el sabor y el color. Así, en la industria cárnica actual, el curado consiste en la producción de un determinado pigmento cárnico termoestable y la obtención del sabor característico de la carne curada.

Se podría decir que existen casi tantos tipos de embutidos como áreas geográficas e incluso como fabricantes y, aunque la base de su fabricación es siempre una combinación de procesos de fermentación y desecación, existen claras diferencias regionales. Así, en los países mediterráneos, Portugal, Hungría y los Balcanes predominan los embutidos elaborados con especias y secados al aire, mientras que en el centro y norte de Europa, la fermentación va acompañada de un proceso de ahumado, siendo la desecación menos intensa y en los Estados Unidos son comunes los embutidos semicurados, fermentados rápidamente a altas temperaturas y con un corto periodo de secado (Lücke, 1984).

En la actualidad, la fabricación de embutidos crudos curados representa una parte muy importante de la industria cárnica en la Europa Continental, siendo su área de mayor influencia los países mediterráneos y Alemania, uno de los principales países productores de embutidos, aunque su desarrollo ha sido tardío (a partir de la segunda mitad del siglo XIX). Hoy en día, estos productos cárnicos están adquiriendo cada vez mayor interés en países en los que hasta hace poco apenas se conocían, como Estados Unidos, Australia, Gran Bretaña, Brasil y Japón. En España, de acuerdo con los datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, la producción de embutidos crudos curados superó en 1992 las 166.000 Tm., lo que representa aproximadamente una quinta parte de la producción total de preparados cárnicos, con un valor de unos 100.000 millones de pesetas. Estas cifras, unidas al hecho de que se trata de un mercado todavía en expansión dan una idea clara del destacado lugar que

ocupan estos productos en la industria alimentaria de nuestro país.

## **I.2.- PROCESO DE ELABORACION DE LOS EMBUTIDOS CRUDOS CURADOS**

Existen diversos artículos de revisión bibliográfica del proceso de elaboración de estos productos, entre los que destacan los de Palumbo y Smith (1977), Liepe (1982), Lücke (1984) y Frey (1985). En líneas generales la fabricación de embutidos comprende tres fases bien definidas: mezcla de los ingredientes, fermentación y maduración o secado.

### **I.2.1.- MEZCLA DE LOS INGREDIENTES**

Durante esta fase, como su nombre indica, se preparan y mezclan los distintos ingredientes previamente formulados: carne, tocino, sales, especias y aditivos. Una formulación típica de un embutido crudo curado es la recogida en la tabla I.1., que es una aproximación adaptada de la composición descrita por diversos autores (Lücke, 1984; Nychas y Arkoudelos, 1990) en sus artículos.

**Tabla I.1.-** Formulación típica de un embutido crudo curado

<b>Ingrediente</b>	<b>%</b>
Carne magra	55 - 70
Grasa (tocino)	25 - 40
Sales de curado y azúcares	~5
Especias	0,5
Otros (incluyendo coadyuvantes iniciadores, acidulantes, etc.)	0,5

### **I.2.1.1.- Ingredientes**

#### **I.2.1.1.1.- Carne**

Según los hábitos de consumo, costumbres y gustos de cada zona se puede emplear carne de cerdo, vacuno, caballo, etc. Su aptitud tecnológica dependerá de su pH final, capacidad de retención de agua y de la intensidad de color que se desee en el producto. Debido a ésto, en la práctica parece ser muy recomendable la utilización de carne de animales adultos (Lücke, 1984).

#### **I.2.1.1.2.- Grasa**

En general, debe ser grasa firme, con un punto de fusión alto y, en definitiva, con un bajo contenido de ácidos grasos insaturados, ya que éstos conllevan un más rápido enranciamiento y exudación de la grasa del embutido (Frey, 1985). Constituyen una excepción los embutidos elaborados a partir de cerdo ibérico, cuya grasa se caracteriza por un alto nivel de insaturación, que les dota de unas propiedades características para el desarrollo de su sabor y aroma típicos.

Como los tejidos grasos procedentes de rumiantes son menos aceptables organolépticamente, en la fabricación de embutidos crudos curados suele utilizarse, según Lücke (1984), grasa de cerdo y en general se emplea el tocino dorsal.

#### **I.2.1.1.3.- Agentes del curado**

Entre ellos se encuentra en primer lugar el **cloruro sódico** (NaCl). Esta sal es importante desde el punto de vista del sabor pero también tecnológicamente, ya que reduce el valor de la actividad de agua, con lo que restringe el crecimiento de ciertos microorganismos no deseables, influye en la

textura al permitir la solubilización de las proteínas de la carne y gobierna las reacciones químicas y enzimáticas que discurren durante la maduración de los embutidos. Se suele añadir un 2,4-3% del peso total de la masa.

Son también agentes del curado los **nitratos** y **nitritos** ( $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$ ), imprescindibles para el desarrollo del color por interacción con el pigmento cárnico (mioglobina), la selección de la flora microbiana deseable (con la consiguiente repercusión en el aroma) y la inhibición de microorganismos no deseables, además de inhibir la autooxidación lipídica. Los nitratos se formulan en embutidos de maduración larga, en cantidades de 200-600 p.p.m. (Lücke, 1984), mientras que los nitritos se incorporan a embutidos de maduración más corta y su cantidad no suele exceder de 150 p.p.m. Wirth (1973) señala que 50 p.p.m. de nitritos parecen ser suficientes para el desarrollo del color y del aroma derivados de estas sales.

#### **I.2.1.1.4.- Especies y condimentos**

Son muy variados: pimienta, pimentón, ajo, enebro, etc. Se utilizan, bien para reforzar el sabor y aroma ácido suave típico de los embutidos (como suele ser en el caso de la pimienta) o para dotarlos de un sabor peculiar. Se emplean más en los embutidos secados al aire que en los ahumados y algunas especias contienen potentes sustancias antioxidantes (Hammer, 1977; Mendiola y col., 1990). Además, se ha descrito que ciertas especias ejercen un efecto estimulante del crecimiento de los cultivos iniciadores (Vandenriessche y col., 1980), con lo que se acelera el descenso del pH (Nes y col., 1984). Dicho efecto se ha atribuido al contenido de glucosa y de trazas de manganeso de estos ingredientes (Farkas y col. 1988).

### **I.2.1.1.5.- Aditivos**

En la "Lista Positiva de Aditivos y otros productos para uso en la elaboración de los productos cárnicos embutidos crudo-curados y para tratamiento de superficie de los mismos" (Orden de 13 de enero de 1986 del Ministerio de Sanidad y Consumo, B.O.E. de 22 de enero de 1986) se recogen 8 grupos:

**1.- Colorantes:** cochinilla (ácido carmínico), carotenoides, xantofilas, etc. En el caso de los colorantes artificiales la dosis máxima de uso es 300 p.p.m. solos o en combinación, mientras que en los naturales la legislación hace referencia a las buenas prácticas de fabricación.

**2.- Conservadores:** por ejemplo el ácido sórbico y sus sales sódicas y potásicas. Tienen un efecto conservante que tiende a mantener la superficie del embutido libre de bacterias y, sobre todo, de mohos. La dosis máxima de uso es 1.000 p.p.m., expresado en términos de ácido sórbico.

La legislación recoge también en este apartado a nitratos y nitritos y sus dosis máximas son, respectivamente, 300 p.p.m. y 150 p.p.m.

**3.- Antioxidantes:** naturales como los tocoferoles o artificiales como por ejemplo ácido ascórbico y ascorbatos. Además del efecto antioxidante proporcionan un medio reductor que favorece la transformación del nitrato en óxido nítrico, con lo que mejoran y estabilizan el color. La dosis máxima para los antioxidantes naturales la establecen las buenas prácticas de fabricación (B.P.F.) mientras que para los ascorbatos es 500 p.p.m., expresados en términos de ácido L-ascórbico.

**4.- Estabilizantes, emulgentes, espesantes y gelificantes:** fosfatos (no más de 3.000 p.p.m. en el producto terminado correspondientes a

fosfatos añadidos), caseinatos, proteína de soja, etc.

**5.- Potenciadores del sabor:** ácido glutámico y glutamatos (dosis máxima de 2.000 p.p.m.), ácido guanílico y guanilatos (dosis máxima 50 p.p.m.), etc.

**6.- Reguladores del pH:** ácido láctico, ácido cítrico, glucono- $\delta$ -lactona, etc. La dosis máxima permitida de esta última es 5.000 p.p.m.

**7.- Reguladores de la maduración:**

#### Azúcares

Se utilizan glucosa, sacarosa, lactosa, etc. Sirven como fuente de energía para los microorganismos presentes en la masa, que los metabolizan, con producción de ácido láctico y el consiguiente descenso de pH. Este ácido gobierna el establecimiento de una flora fundamental para la adquisición de una textura apropiada y participa en el sabor y aroma del producto. Los azúcares se incorporan a la masa en mayor o menor cantidad según el grado de acidificación deseado, ya que si la misma dependiera de la cantidad residual de glucosa de la carne, sería mínima. Según Pyrcz y Pezacki (1981) en los embutidos crudos curados en general no es necesario añadir más que un 0,4-0,8% de carbohidratos fermentables, que proporcionan un descenso de pH hasta valores alrededor de 5,0, lo que asegura una buena estabilidad microbiana y un rápido incremento de la firmeza (Klettner y Rödel, 1978). No obstante, si se utilizan nitratos en lugar de nitritos conviene añadir menos azúcares (0,2-0,3%) para que el pH no inhiba la actividad reductora de las micrococáceas. Esta es la cantidad que se suele añadir en los embutidos crudos curados europeos (Lücke, 1984).

### Cultivos iniciadores

Los microorganismos juegan un papel decisivo en la maduración de un embutido, ya que realizan la reducción de nitratos a nitritos y de éstos a óxido nítrico (que estabiliza el color), provocan el descenso del pH de la masa, intervienen en la formación de compuestos aromáticos y sápidos e influyen en la capacidad de conservación del producto.

Hasta épocas recientes la elaboración de embutidos se basaba en una "fermentación natural", gobernada entre otros factores por los microorganismos llegados accidentalmente a la carne y confiando en las condiciones climáticas de las zonas geográficas donde se elaboraban. El empleo de cultivos iniciadores en los derivados cárnicos se desarrolló a partir de su utilización en la fabricación de quesos. Los primeros estudios fueron realizados por Cesari (1919) y Cesari y Guilliermond (1920), que recomendaron el empleo de cultivos puros de levaduras para mejorar el sabor y aroma de los embutidos, pero fueron Jensen y Paddock (1940) quienes introdujeron por primera vez en la industria cárnica el empleo de un cultivo compuesto por cepas del género *Lactobacillus*. Hoy en día los géneros bacterianos utilizados con éxito como iniciadores cárnicos son *Micrococcus* (Niinivaara, 1955; Nurmi, 1966), *Lactobacillus* (Nurmi, 1966; Everson y col., 1970) y *Pediococcus* (Deibel y Niven, 1957) y su empleo es práctica habitual en la industria como una forma de controlar el proceso madurativo y conseguir, junto con otros parámetros (temperatura, humedad relativa, etc.) un producto final de una calidad, consistencia y vida útil uniformes. No obstante, aún no se han abandonado completamente los métodos tradicionales y, de hecho todavía existen fábricas donde se producen grandes cantidades de embutidos de forma "natural". En Europa se utilizan principalmente cultivos de *Micrococcus/Staphylococcus* con o sin *Lactobacillus* y/o *Pediococcus*, mientras que en Estados Unidos predominan los de *Pediococcus* (Liepe, 1982). Esto marca la diferencia entre los embutidos de distintos continentes y países.

**8.- Aditivos para tratamiento de superficie.** Pimaricina (como máximo 1,2 mg/dm<sup>2</sup> de superficie del embutido).

#### **1.2.1.2.- Formación de la masa original**

La carne y la grasa se pican y se mezclan con el resto de los ingredientes procediendo a su amasado. Esta operación se realiza en frío (2 °C) y el grado de reducción de tamaño varía según el tipo de embutido, pero, en todo caso, debe conferir al producto final una adecuada consistencia al corte, sin que se produzca la separación de la materia grasa. (Frey,1985). A continuación, para favorecer la interacción entre los componentes de los ingredientes y la ligazón de la pasta, se deja ésta en reposo en cámara de refrigeración durante unas 24-48 horas. Transcurrido este periodo, se procede al embutido de la masa en tripas. Durante esta operación es muy importante excluir de la misma la mayor cantidad posible de oxígeno, ya que podría interferir en el desarrollo del color y sabor deseables en el producto final. Esto se consigue, a nivel industrial, con el empleo de máquinas embutidoras a vacío.

Las tripas que se utilizan pueden ser tanto naturales como sintéticas y, aunque muchos fabricantes siguen prefiriendo las naturales, las sintéticas están ganando cada vez más importancia debido a la falta de problemas en su manipulación y a la precisión de su calibre. Las propiedades fundamentales de las tripas utilizadas en la fabricación de embutidos son su elasticidad y su permeabilidad al vapor de agua. La elasticidad es decisiva para la retracción de la envoltura que se produce al desecarse el embutido, lo que evita la aparición de arrugas en la superficie. El coeficiente de difusión del vapor de agua a través de la tripa también es importante dado que, por ejemplo, las envolturas que exhiben una gran permeabilidad favorecen una desecación excesiva de las partes más superficiales del producto. Por eso, una vez embutida la masa, las condiciones ambientales deben graduarse de acuerdo con las propiedades de las tripas. En este sentido es muy importante el calibre escogido, ya que si no se

dispone de cámaras climáticas no son aconsejables las tripas de calibre grueso, porque dificultan la desecación y hacen necesario un control muy riguroso de la humedad relativa ambiental.

### **I.2.2.- FERMENTACION**

Esta fase se lleva a cabo manteniendo los embutidos a 18-26 °C y aproximadamente un 90% de humedad relativa durante 1-3 días. El objetivo es que tengan lugar simultáneamente y de forma adecuada dos procesos de origen microbiano que son cruciales para el desarrollo de las características de estos productos: el descenso del pH de la masa por la acción fermentativa de las bacterias lácticas sobre los azúcares y la reducción de nitratos y nitritos a cargo de las micrococáceas presentes en la mezcla.

La temperatura y la humedad relativa ambiental son dos parámetros que hay que regular con precisión para lograr una fermentación adecuada. A temperaturas mayores que las mencionadas anteriormente se aceleran las reacciones previamente descritas pero también existe un mayor riesgo de crecimiento de microorganismos no deseables (Baumgartner y col., 1980). Desde el punto de vista microbiológico hay que tener en cuenta, además, que la acidificación (es decir, el crecimiento de bacterias lácticas) no sea demasiado rápida, pues de lo contrario inhibiría el desarrollo de las micrococáceas y no se reducirían eficazmente los nitratos y nitritos. Por ello, el uso de la glucono- $\delta$ -lactona, que permite una acidificación rápida al convertirse en ácido glucónico, no es muy útil para la fabricación de embutidos, al menos al estilo europeo. En cuanto a la humedad relativa, si es demasiado baja, puede producirse una deshidratación excesiva y la formación de una costra superficial en el embutido, mientras que si es muy elevada puede dar lugar a un crecimiento excesivo de mohos en la superficie (Lücke, 1984). De ahí la importancia de un sistema correcto de control de la temperatura y la humedad,

así como una ventilación adecuada. Por estas razones, la producción de embutidos se restringía en muchas zonas a los meses de invierno, cuando el clima era favorable para ello. No hay que olvidar que la fabricación dirigida de embutidos no es más que una imitación del proceso natural mediante el uso de cámaras climatizadas.

En el caso de los embutidos ahumados, esta operación se puede realizar durante el desarrollo de la fermentación, de modo muy suave a fin de no inhibir el crecimiento microbiano (hay que recordar que entre los componentes del humo se encuentran potentes sustancias antimicrobianas como, por ejemplo, el formaldehído) o después de concluida, lo cual además de un efecto conservante y aromatizante, produce la inhibición del crecimiento de mohos superficiales. Este también se puede controlar efectuando un drástico descenso de la humedad relativa (hasta un 50%) durante un corto periodo de tiempo (dos horas) inmediatamente después de terminar la fermentación y restableciendo después las condiciones adecuadas para que el proceso siga su curso normal.

### **I.2.3.- MADURACION O SECADO**

Durante esta fase, el embutido pierde gran parte de su peso original a expensas de la reducción del contenido inicial de agua, con lo que se va desarrollando su textura característica. Además, es en esta fase cuando se generan las sustancias aromáticas y sápidas mediante la intervención de enzimas, principalmente de origen microbiano pero también procedentes de la propia carne. Hasta hace no muchos años el resultado final dependía en gran medida del azar (gracias a los microorganismos que se instalaban en la masa y a la benignidad del clima en el momento de la elaboración del producto), pero en la actualidad todos estos procesos se controlan con más rigor merced a la utilización de cultivos iniciadores que se incorporan a la mezcla junto con otros ingredientes durante la operación de amasado y al empleo de cámaras

climatizadas.

Las condiciones ambientales que se establecen durante este periodo son una temperatura de 12-15 °C y una humedad relativa decreciente de forma progresiva hasta valores de 70-75%, siendo imprescindible, por supuesto, una buena ventilación a efectos de conseguir una desecación uniforme y homogénea en los embutidos. La duración de esta fase es variable: alrededor de dos semanas en los embutidos de maduración rápida, entre tres y cuatro los de maduración mediana y más de ocho semanas los de maduración lenta (Rödel y Stiebing, 1989), pudiendo llegar hasta varios meses en algunos productos de gran calibre como, por ejemplo, los embutidos en el ciego de cerdo.

### **I.3.- FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CALIDAD DE LOS EMBUTIDOS CRUDOS CURADOS**

La larga vida útil de este tipo de productos radica en la inhibición de los microorganismos putrefactivos debida a la acción conjunta del pH ácido, la actividad de agua reducida (resultado de la adición a la carne de sales, de la generación durante la maduración de sustancias de bajo peso molecular con actividad osmótica y de la deshidratación) y, en los casos en que se someten a ahumado, los agentes antimicrobianos presentes en el humo.

La calidad del producto final está determinada por el color, la ligazón, la consistencia y nitidez al corte, el sabor y aroma y el aspecto general. Estas características evolucionan a lo largo del proceso de elaboración en función del curso del desarrollo microbiano, de las transformaciones que llevan a cabo los microorganismos en los componentes de la masa, a las que tampoco son ajenas las enzimas musculares y del ritmo de deshidratación; factores que en definitiva dependerán de la composición de los ingredientes y de la tecnología utilizada (Burgos, 1981).

#### **I.4.- CAMBIOS QUE OCURREN DURANTE LA MADURACION DE LOS EMBUTIDOS CRUDOS CURADOS**

Durante el proceso de maduración de los embutidos crudos curados tiene lugar un conjunto de cambios físicos, microbiológicos y bioquímicos (en los que intervienen tanto enzimas tisulares como microbianas), responsables de la apariencia, sabor y aroma característicos de estos productos así como de su conservabilidad y seguridad. Estos cambios podrían resumirse en los siguientes (Incze, 1992):

- cambios en la microflora inicial de la masa, en la que pasan a predominar los géneros *Lactobacillus*, *Micrococcus* y *Staphylococcus* como consecuencia principalmente de las condiciones de actividad de agua y pH.

- reducción de nitratos a nitritos y de éstos a óxido nítrico, que reacciona con la mioglobina de la carne para dar lugar al pigmento nitrosomioglobina, responsable del color.

- descenso del pH hasta niveles cercanos al punto isoeléctrico de las proteínas de la carne como resultado de la fermentación microbiana de los azúcares.

- solubilización y gelificación de las proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas como consecuencia del aumento de la concentración de sal, lo que determina la consistencia (Klement y col., 1973; Demeyer y col., 1987).

- deshidratación y, como consecuencia, pérdida de peso que puede alcanzar desde un 20 a un 40-50% al final de la maduración.

- fenómenos proteolíticos que ocasionan la fragmentación parcial de las proteínas y conducen a la liberación de compuestos nitrogenados no proteicos,

que repercuten en el pH y en el sabor y aroma (Mihályi y Körmendy, 1967; Demeyer y col., 1979).

- fenómenos lipolíticos, con liberación de ácidos grasos y compuestos carbonilos, que contribuyen también al pH, sabor y aroma del producto final (Nielsen y Kemner, 1989; Nieto y col. 1989).

#### **I.4.1.- CAMBIOS MICROBIOLÓGICOS**

Los microorganismos que se encuentran en la masa inicial de un embutido juegan un papel fundamental en la calidad del mismo, en tanto que algunos de ellos intervienen en el desarrollo de sus características sensoriales y en su estabilidad y seguridad a través de distintas reacciones: fermentación de los azúcares y acidificación de la masa (bacterias lácticas), reducción de nitratos y nitritos y fenómenos lipolíticos y proteolíticos (micrococáceas). En algunos embutidos, también son útiles los mohos y levaduras, que proporcionan protección frente a la luz, el oxígeno y la deshidratación excesiva, además de participar en las reacciones que van a determinar la calidad organoléptica del producto final (Liepe, 1982).

La carga microbiana de la masa fresca depende fundamentalmente de la que aportan los ingredientes en los embutidos de maduración "natural" y de los añadidos en el cultivo iniciador en el caso que se realice esta operación. La carne fresca obtenida en condiciones higiénicas contiene generalmente una tasa total en torno a  $10^4$  ufc/cm<sup>2</sup> en superficie (Lücke, 1986). Tras su almacenamiento en refrigeración y en condiciones de aerobiosis la flora se compone en su mayoría de bacilos Gram-negativos oxidasa-positivos psicrotrofos, fundamentalmente *Pseudomonas sp.*, aunque también se ha descrito la presencia de miembros de otros géneros como *Achromobacter sp.*, *Flavobacterium sp.*, etc. (McMeekin, 1982; Gill, 1982). También se pueden encontrar enterobacteriáceas psicrotrofas, levaduras, mohos, etc., mientras que

los microorganismos Gram-positivos (bacterias lácticas, micrococáceas, *Bacillus sp.* etc.) sólo se hallan en número reducido (Lücke, 1984).

La contaminación inicial de bacterias totales de la masa en las maduraciones "naturales" (sin adición de cultivos iniciadores) suele cifrarse en tasas de  $10^5$ - $10^6$  ufc/g de embutido, que proliferan hasta alcanzar valores del orden de  $10^8$  ufc/g al final de la fase de fermentación. Luego, estos valores se mantienen en esos niveles durante las dos primeras semanas de la maduración, para declinar suavemente hasta el final del proceso (Sanz y col., 1988; Selgas y col., 1988; Nychas y Arkoudelos, 1990). Por lo que se refiere a los cambios en la composición cualitativa de esta flora "natural", las primeras horas y días del proceso de maduración de los embutidos crudos curados son particularmente críticos, pues en la mezcla inicial no se han estabilizado todavía ni el pH ni la actividad de agua ( $a_w$ ). En esta primera fase del proceso, que corresponde a la fermentación, tienen lugar cambios microbiológicos complejos hasta que prevalece una flora favorable, aunque también pueden desencadenar fenómenos alterativos cuando las condiciones ambientales se desvían de las adecuadas. No obstante, los defectos y alteraciones microbiológicas son muy poco frecuentes en los embutidos elaborados de una forma correcta (Hechelman y Kasprowiak, 1991).

La elaboración de embutidos crudos curados supone, desde el momento de la introducción de la masa con los distintos ingredientes en la tripa, un cambio de las condiciones microambientales en aquélla que favorecen el crecimiento y desarrollo de una serie de microorganismos distintos a los predominantes en la carne fresca. La adición de agentes del curado (cloruro sódico, nitratos y nitritos) y especias, la reducida tensión de oxígeno en la mezcla y la deshidratación, crean unas condiciones de  $a_w$ , acidez y anaerobiosis, que, junto con el ahumado (en su caso), favorecen esta "inversión microbiana". En tales condiciones, la flora que se desarrollará serán

microorganismos Gram-positivos, más resistentes al descenso de la  $a_w$  que la flora Gram-negativa y anaerobios estrictos o facultativos (Domínguez y col., 1989): en definitiva, *Lactobacillus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Pediococcus sp.*, *Leuconostoc sp.* y *Bacillus sp.* en el interior de la masa y mohos y levaduras en la superficie. Estos dos últimos grupos suelen ser muy tolerantes a bajos niveles de pH y actividad de agua, pero necesitan altas tensiones de oxígeno para desarrollarse (Hechelmann y Kasprowiak, 1991).

Por el contrario, las condiciones de pH, tensión de oxígeno,  $a_w$  y concentración de sal contribuirán a inhibir a otros grupos microbianos no deseables, como *Pseudomonas sp.* (Hechelmann y col., 1977), enterobacteriáceas (Grau, 1981; Gill, 1982), *Staphylococcus aureus* (Metaxopoulos y col., 1981 a,b; Martínez y col., 1986), *Listeria monocytogenes* (Hechelmann y Kasprowiak, 1991) y *Clostridium botulinum* (Christiansen y col., 1975).

Entre los microorganismos favorables, la tendencia general es un crecimiento precoz de las micrococáceas hasta valores superiores a  $10^6$  u.f.c./g (Selgas y col., 1988) y un poco más tardío de los lactobacilos, que alcanzan finalmente tasas superiores, del orden de  $10^8$  u.f.c./g y cuyo desarrollo es la causa principal del declive de aquéllas (Burgos, 1981), ya que son ácido-lábiles. Aunque es difícil generalizar, pues existen diferencias considerables incluso entre cepas de la misma especie, se puede decir que a niveles bajos de pH y baja tensión de oxígeno los microorganismos predominantes son del género *Lactobacillus*. Además, muchos lactobacilos pueden crecer en condiciones de refrigeración. No obstante, se ha descrito (Ayroulet y Fournaud, 1976; Sarra y col., 1982) que en algunos embutidos franceses, italianos y húngaros elaborados con nitratos, sin adición (o apenas) de azúcares y sin ahumar, el número de micrococáceas puede exceder al de lactobacilos.

En los embutidos secados al aire, con muy ligero o nulo ahumado y siempre que no se utilice una humedad relativa demasiado baja, se forma durante el proceso de maduración una capa superficial de mohos y levaduras. Este recubrimiento superficial es deseable en ciertos productos como algunos salchichones y fuets españoles y salamis italianos y húngaros. Dadas las temperaturas relativamente bajas que dominan durante la fase de secado, la flora de mohos está representada principalmente por el género *Penicillium* (Leistner y Eckardt, 1979). La presencia de especies del género *Aspergillus* es más frecuente en jamones y embutidos procesados a temperaturas más elevadas. En cuanto a las levaduras, se trata fundamentalmente de especies del género *Debaryomyces* (Leistner y Bem, 1970; Comi y Cantoni, 1980).

El ahumado tiene un efecto adverso en los mohos superficiales, y, dentro de las bacterias, actúa más sobre las micrococáceas que sobre los lactobacilos, no sólo por su sensibilidad a ciertos componentes del humo, sino también porque al necesitar oxígeno para crecer, se desarrollan mejor en las zonas más externas del embutido, donde su exposición al humo es mayor (Lücke, 1986).

Una forma de gobernar la actividad microbiana en el embutido es la adición de cultivos iniciadores, que son ampliamente utilizados hoy en día para orientar los procesos madurativos en la dirección deseada, además de inhibir el crecimiento de microorganismos no deseables (Landvogt y Fischer, 1991). Se trata, como ya se ha citado en el apartado I.2.1.1.5., de microorganismos acidificantes (géneros *Lactobacillus* y *Pedicoccus*) y nitrato y nitrito-reductores (géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus*) y, según el producto, mohos y levaduras; todos ellos seleccionados por su actividad y capacidad de desarrollarse en las condiciones que se crean en los embutidos durante su maduración. Cuanto menor sea la carga microbiana espontánea de la masa del embutido y mayor la cantidad y actividad del cultivo iniciador cabe esperar mejores resultados. Dado que se establece competencia por los nutrientes entre ambas floras, iniciadora y "contaminante" (Katsaras y

Leistner, 1988), la diferencia la marcará el número y actividad de ambas. Como mínimo, la tasa de iniciadores fisiológicamente activos debe ser  $10^5$  ufc/g de masa, aunque la utilizada habitualmente es de  $10^6$ - $10^7$  ufc/g (Incze, 1992).

#### **I.4.2.- EVOLUCION DEL pH**

La flora láctica presente en la carne metaboliza los carbohidratos, dando lugar a una serie de compuestos entre los que es mayoritario el ácido láctico; aunque también se pueden originar a partir del piruvato pequeñas cantidades de sustancias volátiles (ácidos fórmico y acético y etanol), lo que parece estar gobernado por tasas bajas de los activadores de la lactato deshidrogenasa y de la piruvato-formato liasa, que desvían el metabolismo del piruvato para la generación de otros compuestos distintos del ácido láctico (Thomas y col., 1980). Como resultado de la acumulación de ácido láctico se produce un descenso del pH de la masa desde niveles iniciales de 5,8-6,2 hasta valores en torno a 5,3 o inferiores (Lücke, 1984; Incze, 1992) en embutidos muy ácidos y 5,5-6 en embutidos poco ácidos (Radovanovic y col., 1990; López-Bote y col., 1990) tales como salamis húngaros e italianos y salchichones españoles. Se calcula que para que se produzca un descenso de una unidad de pH se requieren 2,67 g de ácido láctico por 100 g de proteína cruda (Demeyer y col., 1979). Al final de la maduración se produce un ligero incremento del pH como consecuencia del acúmulo de compuestos nitrogenados no proteicos resultado de la actividad proteolítica de los microorganismos y enzimas de la carne (Mihályi y Körmendy, 1967; Demeyer y col., 1979; Verplaetse y col., 1989).

Además de su papel sobre el control microbiano, el descenso del pH ya comentado ejerce una función tecnológica importante. El pH 5,3, cercano al punto isoeléctrico de las proteínas de la carne, determina su gelificación (Klement y col., 1973; Demeyer y col., 1987) con la colaboración del cloruro sódico, que posibilita la solubilización de las proteínas miofibrilares y

sarcoplásmicas, que gelifican formando una trama alrededor de las partículas de grasa y carne. Esta circunstancia contribuye a incrementar la firmeza (Klettner y Rödel, 1978) y a facilitar la eliminación de agua.

Sobre el descenso del pH influyen los siguientes factores:

- carga microbiana inicial de la carne y su composición, que va a incidir en su actividad fermentativa. Los lactobacilos son los microorganismos más universalmente implicados en la fermentación de los azúcares (Burgos, 1981), aunque en algunos tipos de embutidos, como los americanos, son los pediococos (Liepe, 1982). También se cita de forma ocasional (Burgos, 1981) a los estreptococos lácticos (actualmente denominados lactococos).

- temperatura y actividad de agua ( $a_w$ ). Ambos parámetros tienen un efecto directo sobre el crecimiento microbiano, de forma que éste es mayor cuando la temperatura y la actividad de agua son elevadas (Landvogt y Fischer, 1991; Stiebing y Rödel, 1990).

- calibre del embutido y cantidad de oxígeno atrapada en su interior. En los embutidos de calibre pequeño se ve favorecida la difusión del oxígeno atmosférico al interior de la masa, lo que, dado el carácter microaerófilo de las bacterias lácticas, determina una reducción de la actividad fermentadora (Demeyer y Verplaetse, 1985; Demeyer y col., 1987). Este efecto se acentúa cuando la operación de embutido no se ha realizado a vacío.

- pH inicial de la carne. Si éste es inferior a 5,4, la acidificación es excesiva, mientras que si, por el contrario, el pH es elevado (igual o superior a 6,0), la acidificación será deficiente, con los inconvenientes que ambas situaciones conllevan respecto a la deshidratación y la calidad higiénica. En este sentido también es importante considerar que el tocino exhibe un pH

superior al de la carne magra, por lo que las fórmulas de alto contenido graso presentan un pH inicial más alto y una acidificación final menos intensa (Frey, 1985).

- tipo y cantidad de carbohidratos. En general se puede decir que azúcares como glucosa, sacarosa o maltosa dan lugar a una mayor cantidad de ácido láctico y más rápidamente que si se utilizan lactosa, jarabes de almidón o dextrinas (Klettner y List, 1980). En cuanto a su cantidad, si en la masa inicial hay suficiente concentración de carbohidratos fermentables, las bacterias lácticas disminuyen el pH lo bastante como para inhibir a otras bacterias. Sin embargo, el contenido residual de glucosa de la carne fresca tras el "rigor mortis" no da lugar a una reducción significativa del pH (Dalrymple y Hamm, 1975; Fischer y Augustini, 1977), por lo que si se quiere conseguir una acidificación mayor de 5,5 se deben añadir carbohidratos fermentables "extra" (Nychas y Arkoudelos, 1990), cuya cantidad y tipo son importantes en tanto que determinan el ritmo y nivel de descenso del pH así como la composición de la microflora del embutido.

- utilización de acidulantes químicos como ácidos orgánicos o glucono- $\delta$ -lactona. Ambos tipos de compuestos posibilitan un descenso rápido del pH en un corto periodo de tiempo aunque, si bien la conservabilidad y propiedades sensoriales de un embutido acidificado de esta manera son aceptables, no son las mismas que las de un embutido al que se han añadido microorganismos iniciadores (Incze, 1992). Ya se ha comentado en páginas anteriores el deficiente crecimiento de las micrococáceas si la acidificación es muy rápida.

- otros ingredientes que entran a formar parte de la fórmula. Algunas especias tienen efecto estimulante del crecimiento de los microorganismos lácticos (Vandenriessche y col., 1980; Farkas y col., 1988), al igual que la

proteína de soja (Demeyer y col., 1987). Por el contrario, el nitrito sódico puede inhibir los procesos fermentativos (Zaika y col., 1976; Alley y col., 1992).

### I.4.3.- DESARROLLO DEL COLOR

El color rosado-violáceo estable propio de los productos cárnicos curados es el resultado de la interacción de los pigmentos de la carne con las sales del curado (nitratos y nitritos). La sal del curado que tradicionalmente ha sido incluida en las fórmulas (y actualmente sigue siéndolo en los embutidos de maduración larga) es el nitrato potásico, pero para que éste tenga efecto pigmentante debe ser en primer lugar reducido a nitrito. Esta transformación la llevan a cabo en los embutidos ciertos microorganismos, principalmente los de la familia *Micrococcaceae*, que se caracterizan porque producen nitrato (EC 1.6.6.1.-3) y nitrito (EC 1.6.6.4.) reductasas (Liepe, 1982). La actividad nitrato-reductora de las micrococáceas puede llevarse a cabo sin que el microorganismo se multiplique masivamente. De hecho, las tasas de micrococáceas que diversos autores (Palumbo y col., 1976; Sanz y col., 1988; Selgas y col., 1988) han observado en la fase de fermentación se sitúan en torno a  $10^6$  u.f.c./g. La proliferación de estos microorganismos, y por lo tanto su actividad, se ve favorecida por las relativamente bajas temperaturas y las altas concentraciones iniciales de cloruro sódico y resulta inhibida por pH inferiores a 5,0 (Niinivaara y Pohja, 1956; Palumbo y col., 1976) o concentraciones de ácido láctico del orden del 1% (Burgos, 1981). Estas condiciones favorables corresponden a los primeros estadios de la fase de fermentación, cruciales para el desarrollo del color. Una vez formados, los nitritos deben seguir reduciéndose y en esta transformación intervienen agentes reductores químicos, así como también los microorganismos, y entre ellos, además de las micrococáceas se ha indicado que también pueden participar en este fenómeno algunos lactobacilos (Collins-Thompson y Rodríguez López, 1981). No obstante, las experiencias realizadas con un método aséptico de

fabricación de embutidos (Ordóñez y col., 1989) ponen de manifiesto claramente que cuando el cultivo iniciador está exento de micrococáceas, pero sí existen lactobacilos, no se desarrolla el color (García y col., 1992).

Habitualmente, la flora natural de los embutidos contiene suficiente actividad nitrato-reductora como para no precisar la adición de iniciadores, siempre y cuando se controle el ritmo de producción de ácido láctico, ya que las micrococáceas son ácido-sensibles. Por este motivo, en la fabricación tradicional de muchos embutidos artesanales españoles y salamis genuinos no se incorporaban azúcares, con lo que el descenso del pH era menos acentuado, lo que facilitaba la actividad de los microorganismos reductores, a pesar de los problemas sanitarios que puede acarrear un pH relativamente alto. Cuando se utilizan cultivos iniciadores es necesario llegar a un compromiso para que las condiciones ambientales, sobre todo la temperatura, sean adecuadas para que se multipliquen precozmente las micrococáceas sin que se desarrolle rápidamente la flora láctica. Es así como se logra un desarrollo rápido del color y una acidificación lenta y gradual.

El desarrollo del color típico curado tiene lugar en varias etapas. El color del músculo vivo está en función del estado en que se encuentre la mioglobina, normalmente en su forma oxigenada (oximioglobina), de color rojo brillante (Liepe, 1982). Tras el sacrificio del animal, el rápido consumo del oxígeno tisular determina la transformación de la oximioglobina en mioglobina. Durante la operación de corte de la carne, el aumento de la superficie expuesta al oxígeno da lugar a la formación de oximioglobina de nuevo, que es el pigmento dominante en la masa recién embutida. Durante la fase de fermentación la oximioglobina se oxida al reaccionar con el óxido nítrico resultante de la reducción de los nitritos previamente formados a partir de los nitratos, dando lugar a metamioglobina, de color marrón grisáceo (Demeyer y col., 1987; Nychas y Arkoudelos, 1990). Esta reacción ocurre espontáneamente a temperatura ambiente y se acelera en presencia de agentes

oxidantes. Una vez formada la metamioglobina, ésta sufre una nueva reacción de reducción bien a cargo de agentes reductores endógenos (como los grupos reductores de algunos aminoácidos), bien incorporando a la masa sustancias reductoras como el ácido ascórbico (Liepe, 1982). De este proceso global resultan mioglobina y óxido nítrico. Ambos compuestos se combinan para formar nitrosomioglobina, de color rosado-violáceo (Demeyer y col., 1987). Parte de la nitrosomioglobina formada puede desnaturalizarse durante la maduración, dando lugar entonces a otro pigmento, el nitrosohemocromo, que mejora la estabilidad del color, puesto que el óxido nítrico es menos disociable del grupo hemo en este compuesto que en la nitrosomioglobina (Lücke, 1984). Según algunos autores (Demeyer y col., 1987), el principal compuesto responsable del color de los embutidos es el nitrosohemocromo y no la nitrosomioglobina, aunque esta situación ocurre realmente en los productos cocidos, dado que la aplicación de calor conduce a la transformación del primer pigmento en el segundo (Nychas y Arkoudelos, 1990).

En cualquier caso, la estabilidad de los pigmentos de los embutidos es tanto menor cuanto es el pH inferior a 6,0 (Burgos, 1981). Kuchling (1965) señala por ejemplo que a pH y potenciales redox bajos el nitrosohemocromo puede ser oxidado y transformado en colemioglobina por peróxidos procedentes tanto de la autooxidación del tejido graso como de la actividad de las bacterias lácticas mediante la oxidación del lactato (Nychas y Arkoudelos, 1990), tornándose entonces el color del producto en grisáceo o marrón verdoso en presencia de oxígeno (Burgos, 1981; Lücke, 1984; Bacus, 1986). De ahí la importancia de utilizar tejido graso fresco y firme para formar la masa original y de excluir de la misma la mayor cantidad posible de oxígeno durante la operación de embutido (Lücke, 1984).

Es fácil deducir que si se utilizan nitratos, al precisar su reducción a nitritos a cargo de las bacterias, el proceso de desarrollo del color es más lento que si se utilizan nitritos, ya que es un paso previo para que éstos se

transformen en óxido nítrico (NO). No obstante, debido a que en los embutidos crudos curados existe la posibilidad de formación de nitrosaminas (compuestos de probado poder carcinogénico) a partir de la reacción de los nitritos con aminas secundarias y terciarias presentes en la carne, se ha tratado de reducir lo más posible la cantidad de estas sales en la masa. La ventaja de utilizar microorganismos reductores de nitratos es que sus vías metabólicas determinan concentraciones residuales de nitratos y nitritos muy escasas (Pfeil y Liepe, 1974) y por consiguiente una menor formación de nitrosaminas. En relación con ésto, según Skjelkvale y col. (1974) se podría omitir el empleo de nitritos en los embutidos a cambio de utilizar pequeñas concentraciones de nitrato sódico ( $\leq 50$  p.p.m.), que serían suficientes para el desarrollo del color y la inhibición de clostridios. De todas formas, Wirth (1973) y Lücke (1984), señalan que los embutidos elaborados sin nitratos y/o nitritos tienen un color grisáceo y un pobre sabor y aroma, además de alterarse rápidamente como consecuencia del enranciamiento oxidativo.

#### **I.4.4.- DESHIDRATAACION**

El peso de un embutido al final de su maduración es siempre considerablemente inferior al de la masa fresca, ya que, según el producto, puede reducirse por deshidratación desde un 15-20% hasta un 50% (Incze, 1992). El agua del embutido migra desde el núcleo del mismo hacia la periferia y se evapora en la superficie, lo que determina una merma de peso prácticamente idéntica a la pérdida de agua, ya que las pérdidas por otros conceptos (por ejemplo, por goteo de grasa) son insignificantes en una correcta elaboración y maduración (Nagy y col, 1989). Aproximadamente 2/3 de la merma total de peso corresponde a pérdidas de agua periférica, proporción que se mantiene prácticamente constante durante todo el proceso, aunque ya en los primeros días de la maduración se produce una disminución del contenido de agua en la zona central, que va acentuándose a medida que aumenta la pérdida total de peso. Cuanto mayor es la velocidad de secado la cantidad de

agua que se elimina en la zona central es mayor, al contrario de lo que sucede con el agua periférica (Stiebing y Rödel, 1988).

La reducción del contenido de agua obviamente influye en el descenso de la actividad de agua ( $a_w$ ). Al inicio de la fabricación y como consecuencia de la adición de las sales del curado a la masa original, la  $a_w$  se sitúa alrededor de 0,95-0,96 (Löttsch y Rödel, 1974; Serrano Moreno, 1979; Stiebing y Rödel, 1988), para alcanzar niveles finales próximos a 0,90, que podría ser considerado como un valor común a la mayoría de los embutidos (Burgos, 1981). No obstante, en salchichones españoles y muchos salamis húngaros e italianos se han determinado valores de 0,78-0,82 (León-Crespo y col, 1978; Lücke, 1984). El descenso inicial de la  $a_w$  hasta valores de 0,95-0,96 por la adición de las sales del curado tiene, en opinión de algunos autores (Ordóñez, comunicación personal), una importancia crucial. Es un hecho bien conocido que la alteración de la carne fresca refrigerada corre a cargo de bacterias aerobias Gram-negativas, fundamentalmente *Pseudomonas sp.* Estas bacterias son muy sensibles al descenso de la  $a_w$ , de tal forma que en presencia de los valores de  $a_w$  anteriormente citados son fuertemente inhibidas (Troller, 1987). Es aquí donde radica que dichas bacterias no puedan crecer y se favorezca el desarrollo de las bacterias lácticas y las micrococáceas, más resistentes al descenso de la  $a_w$ .

La pérdida de agua del embutido y la velocidad con la que se lleva a cabo inciden de forma muy importante en la retracción de volumen y la ligazón de la pasta (Burgos, 1981) y dependen de una serie de factores de regulación externos e internos:

Entre los factores externos se encuentran la temperatura y humedad relativa ambientales y el tiempo de maduración. Los dos primeros están muy

relacionados entre sí, ya que según su temperatura, el aire puede retener una determinada cantidad de vapor de agua hasta alcanzar su grado de saturación, de manera que al aumentar la temperatura aumenta la capacidad del aire para captar vapor de agua (Frey, 1985). Así pues, es importante que exista un gradiente de humedad entre el interior del embutido y el aire circundante para que se produzca la deshidratación. Si dicho gradiente es muy acusado, la desecación será muy intensa en la periferia y se formará una costra superficial reseca e impermeable que impedirá la eliminación de agua de las capas inferiores y favorecerá por lo tanto la multiplicación de los microorganismos no deseables. En las cámaras climáticas, un factor muy importante a regular es la velocidad de circulación del aire, que permitirá una mayor velocidad de deshidratación cuanto mayor sea, pero sin sobrepasar ciertos límites que provocarían también la formación de costras superficiales.

Como factores de regulación internos cabe citar:

- composición de la masa original. Según Klettner y Rödel (1980) una mayor cantidad de tocino en la masa proporciona un menor contenido de humedad y una más baja actividad de agua iniciales en la misma, de forma que la deshidratación es menor. Además, estos autores han encontrado influencias del contenido de grasa en el descenso del pH, con un efecto indirecto en la velocidad de deshidratación. La carne de bóvido pierde más agua que la de cerdo (Roziar, 1969) y la de animales viejos se deshidrata más lentamente que la de animales jóvenes.

- grado de picado y calibre del embutido. Un picado fino permite una mayor capacidad de retención de agua y la desecación es, por lo tanto, más lenta (Stiebing y Rödel, 1988). Los embutidos de tripa estrecha se deshidratan con mayor rapidez, dado que la relación superficie/volumen es mayor (Burgos, 1981).

- el pH, a través de su efecto en la capacidad de retención de agua de las proteínas de la carne, influye también de forma importante en la deshidratación de los embutidos, de forma que la velocidad es mayor cuanto más bajo es el pH hasta valores de 4,5-5 en ausencia de sal y de 4 en presencia de las concentraciones habitualmente utilizadas. En cambio, la acción del cloruro sódico es controvertida, ya que según algunos autores incrementa la pérdida de agua (Roziar, 1969) mientras que para otros no ejerce ninguna influencia (Palumbo y col., 1976). De todos modos, su efecto en la capacidad de retención de agua en combinación con el pH hace pensar que la velocidad de deshidratación será mayor a pH inferiores a 5,0 y menor a pH más altos (Burgos, 1981).

#### **I.4.5.- DESARROLLO DEL SABOR Y AROMA DE LOS EMBUTIDOS**

Las sustancias responsables del sabor y aroma de los alimentos se encuentran presentes en cantidades muy pequeñas, a veces en niveles de p.p.m. ó p.p.b. (Maarse y Belz, 1981). Muchas de ellos son volátiles con propiedades aromáticas y otras no volátiles con propiedades sápidas y táctiles. También intervienen en el desarrollo de estas propiedades sensoriales los potenciadores y sinergistas (Dwiwedi, 1975). Estos son compuestos que por sí mismos no tienen propiedades aromáticas y sápidas, pero refuerzan el efecto de otros que sí las poseen. Entre ellos se encuentran ciertos aminoácidos de 5 átomos de carbono y algunos 5'-nucleótidos. Los más importantes son ácido glutámico, glutamato monosódico y ácido inosínico (Moody, 1983).

La carne cruda presenta un sabor característico y un aroma poco marcado. En los productos cárnicos estas características se modifican dependiendo fundamentalmente de su composición (Sink, 1979). Las proteínas, lípidos y carbohidratos de la carne son las principales fuentes de sustancias aromáticas y sápidas. Del tipo y la proporción de estos precursores, así como

de otros ingredientes que se añadan y de la forma en que el procesado afecte a su composición dependerá el gusto característico de cada producto.

El origen de las sustancias responsables del sabor y aroma de los embutidos crudos curados es variado. Unas se incorporan durante el proceso de elaboración (cloruro sódico, especias, componentes del humo), algunas se forman a partir de sus precursores sin intervención microbiana (por ejemplo las sustancias derivadas de las reacciones de autooxidación), otras provienen de la actividad de enzimas propias del músculo (lipasas y proteasas) y un gran parte proceden de la actividad metabólica de los microorganismos (Lücke, 1984). La flora microbiana produce durante la maduración profundas transformaciones de las proteínas y lípidos de los embutidos, que, al igual que algunas de las inducidas en los carbohidratos, afectan sustancialmente a su sabor y aroma (Burgos, 1981).

En los embutidos de maduración corta, los compuestos que predominan son los productos de la fermentación microbiana de los carbohidratos, principalmente ácido láctico (Lücke, 1984). Cuanto más se prolonga la maduración y mayor es la actividad de los microorganismos, se libera una mayor variedad y cantidad de componentes aromáticos y sápidos (Langner, 1972), que proporcionan al embutido un sabor y aroma más complejo y característico. Probablemente los productos de la degradación de las proteínas (péptidos, aminoácidos libres, etc.), nucleótidos y nucleósidos tienen un efecto más pronunciado en el sabor, mientras que los productos de la lipólisis y la posterior degradación de los ácidos grasos (ácidos grasos volátiles, aldehídos, cetonas, etc.) serían más importantes para el aroma final del producto (Stahnke y Zeuthen, 1992).

En relación con otros ingredientes de los embutidos esenciales para el desarrollo de su sabor y aroma, los nitritos y el cloruro sódico son los dos más distintivos. El primer estudio riguroso del papel desempeñado por los nitritos

en el desarrollo del sabor y aroma a "curado" típico de estos productos fue realizado por Cho y Bratzler (1970), que compararon el *M. longissimus dorsi* de cerdo curado experimentalmente en salmueras con y sin nitritos. Estos autores señalaron, mediante análisis sensorial, la existencia de diferencias significativas entre ambas muestras. Además, las muestras curadas con nitritos fueron juzgadas como poseedoras de un sabor y aroma a "curado" más intenso. También demostraron que la diferenciación era posible aunque la carne se ahumara y aunque se eliminara el cloruro sódico de la salmuera. La necesidad del empleo de nitritos para el desarrollo de un sabor y aroma a "curado" adecuado ha sido demostrada también en productos cárnicos picados, como salchichas tipo Frankfurt (Wasserman y Talley, 1972; Simon y col, 1973) y jamones curados (Bailey y Swain, 1973).

A pesar de que los nitritos están estrechamente relacionados con el sabor y aroma de los productos cárnicos curados es poco lo que se sabe acerca de los mecanismos implicados. Dichos mecanismos no se han asociado a la formación de compuestos específicos, sino que para la mayoría de los autores se centra en su actividad inhibidora de los procesos oxidativos de los lípidos (Pearson y col., 1977; Price y Green, 1978; Igene y Pearson, 1979; MacDonald y col., 1980). De esta manera las carnes curadas con nitritos presentarían un sabor y aroma más adecuado y, además, se retendría más tiempo debido a la escasez de sustancias con sabor rancio. Probablemente, las cantidades utilizadas en las prácticas habituales de curado son mayores que las necesarias para el desarrollo de un sabor y aroma característico (Ingram, 1974; Dethmers y col., 1975; MacDougall y col., 1975; Williams y Greene, 1979), ya que este efecto se puede observar con niveles de nitritos tan bajos como 50 p.p.m. (Sato y Hegarty, 1971; MacDonald y col., 1980). La actividad antioxidante de los nitritos es el resultado de la interacción del óxido nítrico con las hemoproteínas (Igene y col., 1979), la reacción del oxígeno con el óxido nítrico, la formación de un antioxidante específico asociado a los lípidos polares (Zubillaga y col., 1984) y la terminación de la cadena de reacciones de

autooxidación (Sebranek y Fox, 1985).

En cualquier caso, los niveles de nitritos necesarios para el desarrollo de un sabor y aroma curado satisfactorio son variables dependiendo del producto y están en función de la naturaleza de la carne, las especias añadidas, el grado de ahumado y las hábitos de consumo. El ahumado supone un factor importante de enmascaramiento en la apreciación del sabor y aroma de los productos curados que se someten al mismo. En el análisis sensorial de salchichas tipo Frankfurt ahumadas, Wasserman y Talley (1972) demostraron que se podía diferenciar entre productos preparados con y sin nitritos, pero que eran mejor juzgadas las muestras ahumadas y sin nitritos que las que contenían nitritos.

El cloruro sódico, por sí mismo, intensifica poderosamente el sabor de todos los productos cárnicos (Wasserman y Kimoto, 1977; Price y Greene, 1978; Froehlich y col., 1983), pero además interviene en la producción de otras sustancias aromáticas y sápidas y potencia el gusto general del producto (Sebranek y Fox, 1985). Para Greene y Price (1975) sería el principal factor responsable del sabor a "curado", más que la "ausencia" de oxidación lipídica o los nitritos. Es un agente prooxidante, lo que determina un acúmulo de compuestos asociados a sabores rancios (Neer y Mandigo, 1977; Rhee y col., 1983), pero también cataliza la formación de óxido nítrico, por lo que podría iniciar procesos inhibitorios en estadios tempranos del procesado y contrarrestar su propio efecto oxidante (Sebranek y Fox, 1985).

#### **I.4.5.1.- Compuestos volátiles de los embutidos**

El sabor y aroma de la carne y de sus derivados está en función de una gran variedad de compuestos volátiles de diferente naturaleza química presentes en determinadas proporciones cuantitativas. La caracterización de dicha fracción volátil resulta complicada y mucho más la asignación a cada una

de las sustancias de su cuota de participación en el sabor y aroma. En los productos cárnicos curados, la mayoría de los estudios han sido realizados antes del desarrollo de técnicas instrumentales adecuadas, como la combinación de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). Además, la falta de uniformidad de criterios en cuanto a las técnicas de aislamiento y separación empleadas para estos compuestos dificulta la comparación de los resultados de los distintos trabajos, por lo que deben ser analizados individualmente. No obstante, se pueden establecer una serie de conclusiones generales.

Las sustancias volátiles responsables del aroma típico a "curado" residen fundamentalmente, en opinión de Piotrowski y col. (1970), en el componente lipídico. Una gran parte de estas sustancias está relacionada con los cambios hidrolíticos y oxidativos experimentados por dicho componente durante el periodo de maduración (Nurmi y Niinivaara, 1964; Alford y col., 1971; Berdagué y col., 1992). En este sentido es importante la composición de los lípidos de la carne, pues ello va a determinar la acumulación de distintos productos de las reacciones anteriormente citadas. Pero el papel de los lípidos en el desarrollo del aroma de los productos curados es doble, ya que, además de ser precursores de sustancias volátiles constituyen el medio en que se solubilizan y quedan retenidos los componentes aromáticos de naturaleza apolar, tanto de origen lipídico como no lipídico (Naes y col., 1992). Esta circunstancia tiene mucha importancia en los productos ahumados (Dwivedi y col., 1975).

En el aroma típico de los embutidos crudos curados se puede distinguir, además de dicho matiz "rancio" y "curado", un matiz "ácido-láctico" relacionado sobre todo con el catabolismo de los carbohidratos y que predomina en los embutidos de maduración corta (Lücke, 1984; Berdagué y col., 1992). Por lo tanto, en la composición de volátiles de estos productos influye sustancialmente la actividad de la flora microbiana que coloniza la masa inicial.

Los compuestos volátiles de los productos curados pueden tener un origen puramente químico (como es el caso de los productos de la autooxidación de los lípidos) o ser el resultado de procesos enzimáticos. En los productos no inoculados como el jamón curado, la actividad enzimática es endógena, mientras que en los productos fermentados como los embutidos intervienen también enzimas exógenas, es decir, microbianas. Sin embargo, es muy difícil establecer los papeles respectivos de las enzimas tisulares y microbianas en el desarrollo del sabor y aroma de los embutidos crudos curados. Berdagué y col. (1992) han estudiado la influencia de los cultivos iniciadores en el contenido de volátiles de los embutidos crudos curados, llegando a la conclusión de que el tipo de microorganismo y especialmente la especie de *Staphylococcus* utilizada son los factores que tienen el efecto más marcado en la composición de la fracción volátil de estos productos.

La mayor parte de los productos curados son de carne de cerdo o la contienen como ingrediente principal. Una revisión bibliográfica realizada por Shahidi y col. (1986) muestra que en la carne de cerdo curada se han identificado hasta 135 componentes volátiles, mientras que en la no curada se han encontrado 314, lo que parece indicar que el proceso de curado tiende a simplificar la composición de la fracción volátil de la carne (tabla I.2.). Recientemente, Berger y col. (1990) y Stahnke y Zeuten (1992) han aislado e identificado entre 70 y 80 compuestos volátiles en salamis italianos. La mayoría de ellos probablemente derivan de la degradación de los lípidos tanto por acción de los microorganismos como por reacciones de autooxidación.

Desde un punto de vista cualitativo, no se han encontrado compuestos aromáticos peculiares en la carne curada ni tampoco un único compuesto responsable del aroma a "curado". Prácticamente todos los compuestos volátiles detectados en la carne de cerdo curada se encuentran también en la carne no curada (Ockerman y col., 1964; Cross y Ziegler, 1965; Bailey y Swain, 1973; Gorbato y Lyavskaskaya, 1980; Mottram y col., 1984), excepto

algunos aldehídos, ácidos carboxílicos y ciertos compuestos azufrados. Lo que sí señalan todos los autores es la existencia de importantes diferencias cuantitativas entre ambas fracciones volátiles, que parecen ser la causa determinante de su distinto aroma. Un ejemplo muy ilustrativo en este sentido es la investigación realizada por López y col. (1992). Estos autores estudiaron la fracción volátil de jamones procedentes de cerdos ibéricos alimentados en régimen de montanera (lo que implica grasa altamente insaturada) y con pienso (grasa más saturada) y detectaron las mismas sustancias volátiles, pero en cantidades significativamente mayores en los primeros, atribuyendo la bien conocida preferencia de los consumidores por jamones ibéricos procedentes de cerdos cebados con bellotas a una mayor concentración de sustancias aromáticas y sápidas presentes en los mismos.

En la fracción volátil de los productos curados predominan los carbonilos (aldehídos y cetonas), alcoholes, ácidos carboxílicos y ésteres (Shahidi y col., 1986).

**1.- Carbonilos.** Constituyen el grupo más numeroso. Diversos autores coinciden en indicar que la principal característica que diferencia el aroma de las distintas carnes y productos cárnicos es el perfil de carbonilos, tanto desde el punto de vista cualitativo como, sobre todo, cuantitativo (Hornstein y Crowe, 1964; Sanderson y col., 1966, MacDougall y col., 1975). Estos compuestos surgen principalmente de las reacciones de oxidación de los lípidos y, aunque también pueden derivar de otros fenómenos como la reacción de Maillard o el metabolismo de los aminoácidos, se ha señalado (Gorbatov y Liaskowskaya, 1980; Moody, 1983; Shahidi y col., 1986) que dichas fuentes tienen una escasa repercusión en los productos cárnicos curados.

La concentración de carbonilos aumenta considerablemente durante el periodo de maduración, tanto en los embutidos (Demeyer y col., 1974; Dwivedi, 1975; Burgos, 1981) como en el jamón curado (Ockerman y col.,

1964). En los embutidos ahumados, Demeyer y col. (1974) señalan un aumento de la concentración de carbonilos durante la primera semana de maduración, una posterior disminución tras el ahumado y un nuevo incremento continuado hasta el final del proceso. El incremento inicial se ha atribuido a productos de la fermentación de los carbohidratos (DeKetelaere y col., 1974), mientras que el que ocurre en los últimos estadios se ha indicado que procede de la degradación de los peróxidos lipídicos (Cerise y col., 1973).

En relación con el perfil de estos compuestos, los monocarbonilos son mucho más abundantes que los dicarbonilos, si bien la alta reactividad de estos últimos hace que jueguen un importante papel en el desarrollo del aroma (Mabrouk, 1976).

Los aldehídos, además de contribuir directamente al sabor y aroma de los productos curados, pueden reaccionar con otros compuestos presentes en el medio para producir otras sustancias volátiles (Ohloff y Flament, 1978). El bajo umbral olfatorio de algunos aldehídos hace de ellos importantes sustancias aromáticas en cantidades traza (Ramaswamy y Richards, 1982).

De los aldehídos saturados se dice que dotan de caracteres de fuerza e intensidad al aroma de los productos en que se encuentran, mientras que los 2-enaes y 2,4-dienales determinan matices dulces, afrutados y grasos. Dentro de los aldehídos saturados, los distintos matices son picante (acetaldehído), lechoso (propanal), crudo (hexanal), agrio (octanal) y grasiento (endecanal) (Hamilton, 1989).

Berdagué y col (1992) han detectado 11 aldehídos distintos en embutidos, mientras que López y col. (1992) y Barbieri y col. (1992) han identificado 15-16 en jamones curados. Los aldehídos ramificados (2-metilpropanal, 2-metilbutanal y 3-metilbutanal) se encuentran en estos productos en cantidades similares a las presentes en la carne no curada, aunque dichas cantidades son

considerablemente menores que las de los no ramificados. Estos aldehídos pueden proceder de reacciones de descarboxilación-desaminación (García y col., 1991) o de biosíntesis (Belitz y Grosch, 1987) de algunos aminoácidos.

Los aldehídos de cadena corta (formaldehído, acetaldehído y propanal) se encuentran también en cantidades similares tanto en la carne curada como en la no curada (Cross y Ziegler, 1965), aunque Langner y col. (1970) y Halvarson (1973) creen que la importancia de estos aldehídos de bajo peso molecular en el aroma de los embutidos es escasa. Según señalan algunos autores (Burgos, 1981; Kandler, 1983), aunque su origen puede ser la oxidación lipídica, estos compuestos derivan fundamentalmente de los procesos fermentativos de los carbohidratos.

Los aldehídos de mayor peso molecular (fundamentalmente desde el pentanal al nonanal o decanal) proceden fundamentalmente de la autooxidación lipídica (Grosch, 1988; Berdagué y col., 1991a,b; Frankel, 1991). Estos compuestos sí que desempeñan un papel notable en el sabor y aroma y es muy probable que dada la distinta composición de ácidos grasos de los lípidos de cerdo y bóvido sean las diferencias en el tipo o cantidad de carbonilos producidos a través de estos mecanismos el factor responsable de las distintas características aromáticas que presentan los embutidos elaborados sólo con carne de cerdo y los que contienen además carne de bóvido (Burgos, 1981). El n-hexanal y el n-pentanal, los principales volátiles del jamón sin curar, están presentes en cantidades mucho menores en el jamón curado (Shahidi y col., 1986). Se ha sugerido (Cross y Ziegler, 1965; MacDougall y col., 1975) que las variaciones en el contenido de estos aldehídos constituyen el principal factor responsable de las diferencias en el aroma de ambos tipos de carne. Probablemente esta circunstancia puede hacerse también extensiva a los embutidos. Estas diferencias se deberían a la inhibición de los procesos oxidativos de los lípidos insaturados a cargo de los nitritos en los productos curados. No obstante, el ión nitrito es muy reactivo y parece lógico pensar que

reaccione con otros componentes de la carne como compuestos con grupos tiol o amino, para dar lugar a otras sustancias volátiles que también contribuyen al sabor y aroma a "curado" (MacDougall y col., 1975).

Berdagué y col. (1992) y Barbieri y col. (1992) han identificado 11 cetonas distintas en la fracción volátil de embutidos y jamones respectivamente. Entre ellas se encuentra la 3 hidroxí-2 butanona (acetoína), probablemente producto de la descarboxilación del ácido 2 acetoacético (Belitz y Grosch, 1987).

**2.- Alcoholes.** Se forman también durante la oxidación de los lípidos (Watanabe y Sato, 1971; Frankel, 1982). Entre ellos parece que son los alcoholes secundarios no ramificados (como el 1-penten-3-ol y el 1-octen-3-ol) los más significativos en relación con el aroma de los productos curados (Barbieri y col., 1992). Estos compuestos poseen un olor descrito como "fúngico" que contribuiría, junto con algunas cetonas, a suavizar o enmascarar el matiz rancio propio de algunos aldehídos como el hexanal y sobre todo el nonanal (Berdagué y col., 1993). Los alcoholes secundarios pueden originarse también por reducción de las metilcetonas, que se forman, a su vez, durante la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos realizada por mohos (Kinsella y Hwang, 1976). Ambos tipos de sustancias, con un potencial sávido y aromático similar (Forss, 1972), coexisten en equilibrio y se han encontrado abundantemente en quesos madurados por mohos (Fosrs, 1979; Frutos y col., 1991). Es posible que estos compuestos puedan tener también este origen en embutidos en cuya superficie se implantan mohos.

**3.- Ácidos grasos de cadena corta (volátiles).** Además de grandes cantidades de ácido láctico, no volátil, pero de gran repercusión en el sabor, en estos productos se pueden encontrar concentraciones significativas de ácido acético, propiónico y butírico. Los ácidos grasos volátiles son producto

**Tabla I.2.-** Clasificación de los compuestos volátiles de la carne de cerdo

Compuesto	Carne no curada		Carne curada	
	n <sup>o</sup>	%	n <sup>o</sup>	%
Hidrocarburos	45	14,3	4	3,0
Aldehídos	35	11,2	29	21,5
Cetonas	38	12,1	12	8,9
Alcoholes	24	7,6	9	6,7
Fenoles	9	2,9	1	0,7
Acidos carboxílicos	5	1,6	20	14,8
Esteres	20	6,4	9	6,7
Lactonas	2	0,6	-	-
Furanos	29	9,2	5	3,7
Piridinas	5	1,6	-	-
Pirazinas	36	11,5	-	-
Otros nitrogenados	24	7,6	3	2,2
Compuestos azufrados	31	9,9	31	23,0
Compuestos halogenados	4	1,3	1	0,7
Otros	7	2,2	11	8,2
Total	314	100,0	135	100,1

Fuente : Shahidi y col. (1986)

principalmente de la actividad de las lipasas microbianas o musculares sobre los triglicéridos y fosfolípidos, aunque su origen también puede ser el catabolismo de los carbohidratos por desviación del piruvato para formar ácidos grasos de cadena corta (acético y fórmico) (Thomas y col., 1980) por intervención de las bacterias lácticas o por su formación en el ciclo de Krebs en las aerobias. Otra fuente de estos ácidos es la desaminación de los aminoácidos liberados por las proteasas microbianas (Dwivedi, 1975) pero, según Berdagué y col. (1992), la degradación de los aminoácidos tiene una incidencia menor en el contenido de estos volátiles en los embutidos.

**4.- Esteres.** Se trata fundamentalmente de acetatos, propanoatos y butanoatos de diferentes alcoholes y diversos ésteres metílicos y etílicos de ácidos de cadena más larga tanto lineales como ramificados (Peterson y Chang, 1982). Estos compuestos, en especial los ésteres metílicos ramificados de cadena corta se encuentran en mayor cantidad en los embutidos sometidos a periodos de maduración largos (Careri y col., 1992). Los ésteres sólo se forman en cantidades importantes en productos donde se desarrolla actividad microbiana. Esta es una diferencia muy notable entre embutidos y jamones, pues en estos últimos se han encontrado en pequeñas cantidades (García y col. 1991; López y col., 1992).

#### **I.4.5.2.- Glicolisis**

La cantidad y variedad de productos derivados de la fermentación de los carbohidratos en los embutidos depende de varios factores como son el tipo y número de microorganismos que colonizan la masa (Olsen, 1985; Kato y col., 1985; Bacus, 1986; Numata y col., 1988a,b), el tipo y cantidad de carbohidrato añadido a la masa original (Acton y col., 1977; Olsen, 1985; Lee, 1987; Lois y col., 1987), el origen y tratamiento previo de las proteínas de la carne (Townsend y col., 1980; Pezacki y Pezacka, 1987) y la incorporación de

ciertos aditivos como glucono- $\delta$ -lactona (GDL), especias, etc. (Nes y Skejelvale, 1982; Lee, 1987).

*Pediococcus* y *Lactobacillus* son los principales géneros de microorganismos fermentativos de la flora del embutido; fermentan los carbohidratos por la vía Embden-Meyerhoff (EM) (Kandler, 1983; Garvie, 1984; Tetlow y Hoover, 1988), para rendir mayoritariamente ácido láctico a partir del piruvato, mientras que las micrococáceas utilizan esta vía, pero ingresando el piruvato en el ciclo de Krebs (Strasters y Winckler, 1963; Blumental, 1972). La relación de los dos enantiómeros - D(+) y L(-) lactato - depende de la especie del género *Lactobacillus* que esté presente (List y Klettner, 1978; Lücke, 1984). Burchard y col. (1984) han asociado el sabor ácido de los embutidos a una excesiva presencia de ácido D(+) láctico.

Los microorganismos heterofermentativos, que utilizan la vía de los fosfatos de pentosa, producen cantidades iguales de etanol y CO<sub>2</sub> y cuando opera en ellos la vía metabólica "bífida" producen ácido láctico y acético en una relación 2:3 (Gottschalk, 1979). Otros productos de la fermentación de los carbohidratos son acetoína, ácido pirúvico, etc. (Demeyer, 1982; Thornill y Cogan, 1984; Tetlow y Hoover, 1988).

El tipo y cantidad de carbohidrato fermentable constituyen un aspecto importante en tanto que determinan la velocidad de formación y acumulación de ácido láctico. La glucosa y la sacarosa ocasionan un descenso de pH similar durante la fermentación de los embutidos, mientras que el descenso es más lento si se utiliza lactosa (Lücke, 1984, 1985; Olsen, 1985; Lee, 1987). Olsen (1985) señala además que la pauta de descenso del pH en los embutidos no varía significativamente cuando se añaden cantidades de glucosa entre 0,1 y 1%.

### **I.4.5.3.- Proteolisis**

Durante la maduración se degrada una parte considerable de las proteínas. Como resultado, se produce un incremento del nitrógeno no proteico (NNP) del orden del 20% o superior (Langner, 1972; Dierick y col., 1974). Durante la fase de fermentación se produce un aumento de la concentración de compuestos nitrogenados de bajo peso molecular (péptidos, aminoácidos,  $\text{NH}_3$ , etc.), pero tras la misma el nitrógeno peptídico no aumenta, mientras que sí se siguen acumulando las fracciones más pequeñas (Dierick y col., 1974). Todos estos compuestos tienen repercusión en el sabor de los embutidos crudos curados, de manera que un cierto grado de proteolisis será siempre necesario para la obtención de un buen producto. No obstante, una degradación excesiva de las proteínas puede rendir un producto de baja calidad.

Los procesos proteolíticos son de naturaleza enzimática. Hay dos tipos de proteasas: las endopeptidasas y las exopeptidasas. Las primeras parecen actuar sobre todo en el periodo fermentativo y las últimas durante la fase de maduración o secado. Su origen es tanto microbiano como tisular (Verplaetse y col., 1992).

Algunos aminoácidos producto de los fenómenos proteolíticos pueden sufrir posteriores fenómenos de descarboxilación, desaminación, etc., dando lugar a la acumulación de amoniaco y aminas, lo que provoca un ligero incremento del pH del producto (Lücke, 1984). Esta leve alcalinización se observa tanto en productos cárnicos ahumados como en los secados al aire y, en especial, en los embutidos que presentan un recubrimiento superficial de mohos y levaduras, como resultado de la capacidad de éstos de oxidar el ácido láctico. Por otra parte, los aminoácidos, al desaminarse, originan también ácidos orgánicos que, a su vez, pueden transformarse en otras sustancias

volátiles, como aldehídos, alcoholes, etc.

#### **I.4.5.4.- Degradación lipídica**

Los fenómenos degradativos que afectan a los lípidos se estudiarán más detalladamente debido a su relación con el tema de la presente memoria.

Los lípidos constituyen en general la fracción mayoritaria de los embutidos crudos curados y son precursores de muchas sustancias aromáticas a través de fenómenos hidrolíticos y oxidativos que tienen lugar durante el proceso de maduración y que inciden directamente en la calidad organoléptica de estos productos (Demeyer y col., 1974; Melgar y col., 1990). Las enzimas bacterianas y endógenas, además de las condiciones ambientales, son los factores desencadenantes de estos cambios (Coretti, 1965; Cantoni y col., 1967a,b; Melgar y col., 1990), para las que la fase de fermentación o estufaje es una de las más delicadas y decisivas (Rozier, 1969; Mendoza y col., 1983).

Por lo tanto, la composición de ácidos grasos en la masa inicial, en especial la proporción de ácidos grasos saturados e insaturados jugará un papel fundamental en el desarrollo del sabor y aroma de los embutidos. En la tabla I.3. se detalla la composición de ácidos grasos de los lípidos contenidos en los ingredientes principales: carne magra de vacuno y de cerdo y tocino. Este último está constituido casi en su totalidad por triglicéridos, mientras que la grasa del tejido muscular, aunque también está constituida en su mayor parte por triglicéridos (62-80%), contiene un elevado porcentaje de fosfolípidos (16-34%). En ambos casos (tocino y magro de cerdo), alrededor de un 40% de los ácidos grasos son saturados (de ellos una tercera parte es ácido esteárico), un 50% son monoinsaturados (fundamentalmente oleico) y un 10% son poliinsaturados (PUFA).

La grasa del tejido muscular de vacuno constituye un 2-4% de la grasa

**Tabla I.3.-** Composición porcentual de ácidos grasos de las materias primas

Acido graso	Magro de ternera	Magro de cerdo	Tocino de cerdo
C10:0	-	0,16	0,10
C12:0	-	0,16	0,21
C14:0	3,11	1,31	1,36
C16:0	25,96	24,39	24,92
C16:1	4,39	3,44	2,83
C18:0	13,53	11,95	14,14
C18:1	43,88	45,50	43,14
C18:2	3,66	9,66	10,68
C18:3	0,18	0,65	1,05
C20:4	0,54	1,31	-
Otros SFA <sup>a</sup>	2,19	0,33	-
Otros MUFA <sup>b</sup>	2,19	1,15	1,05
Otros PUFA <sup>c</sup>	0,37	-	-
Total saturados	44,79	38,30	40,73
Total monoinsaturados	50,45	50,08	47,23
Total poliinsaturados	4,75	11,62	11,73

<sup>a</sup>SFA, ácidos grasos saturados

<sup>b</sup>MUFA, ácidos grasos monoinsaturados

<sup>c</sup>PUFA, ácidos grasos poliinsaturados

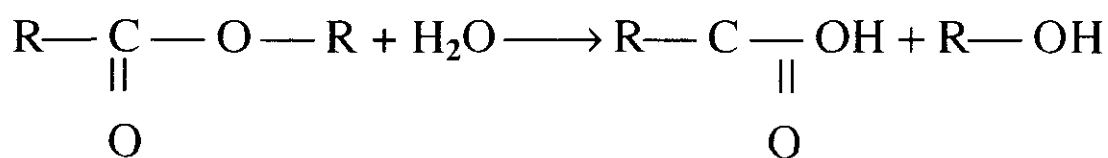
Fuente : Adaptado de Rhee (1992)

total corporal y contiene alrededor de un 4% de fosfolípidos (Wilson y col., 1976). Un 25% de los ácidos grasos de los fosfolípidos presenta 2 y 3 dobles enlaces y más de un 19% tiene 4 o más (Hornstein y col., 1961). Los PUFA de los triglicéridos (fundamentalmente ácido linoleico) suponen un 3-4% del total de ácidos grasos (Hilditch y Williams, 1964). El contenido global de saturados es mayor que el de la carne de cerdo y el de PUFA es significativamente inferior, en torno al 5%.

#### **I.4.5.4.1.- Fenómenos hidrolíticos**

Estos procesos implican principalmente la rotura del enlace éster de los triglicéridos del embutido a cargo de las lipasas, con la consiguiente acumulación de ácidos grasos libres, así como de monoglicéridos y diglicéridos o glicerol, si la hidrólisis afecta a las tres posiciones de esterificación del mismo. Los ácidos grasos liberados son importantes para el sabor y aroma tanto por sí mismos como por ser precursores de otras sustancias a través, principalmente, de reacciones de autooxidación. El resultado es la generación de compuestos aromáticos y sápidos, como las sustancias con grupo carbonilo (Selke y col., 1980). Los ácidos grasos también pueden ser liberados a partir de los fosfolípidos de las membranas, mediante la actividad de las fosfolipasas presentes en las mitocondrias y los lisosomas de las células musculares (Currie y Wolfe, 1977; Cheah y Cheah, 1981; Cheah y col., 1986), si bien parece que la importancia de estos compuestos en la acumulación de ácidos grasos libres en los embutidos es menor que la de los triglicéridos (Demeyer y col., 1974).

Las lipasas o hidrolasas de los ésteres del glicerol (EC 3.1.1.3) son enzimas pertenecientes al grupo de las esterasas e hidrolizan tri-, di-, y monoglicéridos presentes en una interfase lípido-agua, es decir, sólo actúan sobre sustratos insolubles. Como todas las esterasas, rompen los enlaces éster mediante la adición de agua:



éster carboxílico

ácido carboxílico

alcohol

Se pueden encontrar lipasas en numerosos tejidos animales y vegetales y también las producen muchos microorganismos. En los embutidos, la hidrólisis de los lípidos se ha atribuido a la actividad de las lipasas microbianas (Cantoni y col., 1967a,b; Gervasini y Caserio, 1969; Lubienecki v. Schelhorn, 1972; Demeyer y col., 1974; Palumbo y Smith, 1977; Paleari Bianchi y col., 1985; Demeyer y col., 1992), aunque se ha sugerido (Wallach, 1968; Dobbertin y col., 1975; Ferrer y Arboix, 1986b) que durante los primeros estadios de la fermentación existe una intensa actividad de las lipasas del músculo y el tejido adiposo. Esto es lo que parece demostrar el trabajo de García y col (1992), en el que se observa que en embutidos experimentales elaborados asépticamente, la liberación de ácidos grasos es similar, tanto en los lotes inoculados con lactobacilos y micrococos como en los no inoculados. Por su parte, Montel y col. (1993) señalan que las lipasas endógenas de la carne mantienen un elevado nivel de actividad a lo largo de todo el proceso madurativo de los embutidos.

Diversos autores han caracterizado lipasas en el músculo de distintas especies animales (Awad y col., 1968; Cryer y Jones, 1979; Tomita y col., 1984). Igualmente Weglicki y col. (1971) y Franson y col. (1972) han aislado distintas fosfolipasas. Según Sklan y col. (1983) la actividad lipolítica de las fibras rojas es mayor que la de las blancas y recae principalmente sobre los triglicéridos.

Existen también numerosos estudios sobre la actividad lipolítica del tejido adiposo. Según los de Geyer y Goodman (1970), la actividad lipolítica de dicho tejido persiste aún a -8 °C, y sobre ella inciden de forma importante factores como la concentración salina (Acker, 1962; Guardia y Hass, 1967). Belfrage y

col. (1984) han caracterizado lipasas intracelulares de adipocitos de cerdo.

Pero la actividad de las lipasas tisulares en los embutidos resulta pronto frenada por las condiciones que se establecen durante la maduración, pasando a dominar la actividad microbiana (Cantoni y col., 1967a,b; Gervasini y Caserio, 1969; Lubienicki v. Schelhorn, 1972; Palumbo y Smith, 1977). Sin embargo, en otros productos curados parecen intervenir más intensamente y así Cantoni y col. (1970) y Giolitti y col.(1971) sugieren una importante actividad durante la maduración del jamón, dada la evolución de la lipólisis y las bajas tasas de crecimiento que alcanzan los microorganismos lipolíticos durante el proceso.

Muchos microorganismos son capaces de crecer y producir lipasas en diferentes aceites y grasas, incluyendo las de origen animal (Alford y col., 1971; Andersson, 1980). Las bacterias Gram-negativas presentes en la masa inicial (Dobbertin y col., 1975), especialmente el género *Pseudomonas*, pueden iniciar los fenómenos lipolíticos, ya que dichos microorganismos son los mayoritarios en la carne refrigerada (Masana y Lasta, 1992), pero, como ya se ha descrito en apartados anteriores, rápidamente pasan a prevalecer en la masa otros géneros microbianos, las micrococáceas y las bacterias lácticas, por lo que las lipasas elaboradas por las pseudomonas no parecen tener gran trascendencia en los fenómenos lipolíticos que ocurren durante la maduración de los embutidos.

Las micrococáceas son el principal grupo de microorganismos responsable de la lipólisis en los embutidos (Cantoni y col., 1967b; Demeyer y col., 1974; Lücke, 1986; Selgas y col., 1986; Nychas y Arkoudelos, 1990). Selgas y col. (1986) demostraron la capacidad del género *Micrococcus* de hidrolizar triglicéridos de ácidos grasos de cadena larga, que son los más abundantes en los productos cárnicos. Sin embargo, existen diferencias en el comportamiento lipolítico según la especie. Así, los estudios de Talon y col. (1992) sobre una especie comúnmente utilizada como iniciador, *Micrococcus*

*varians* (Lücke, 1986), permiten concluir que, aunque este microorganismo presenta una intensa actividad lipolítica en condiciones experimentales, probablemente no participa en la hidrólisis lipídica durante la maduración de los embutidos. No obstante, la actividad lipolítica de los micrococcos se debe fundamentalmente a lipasas extracelulares (Kilara, 1985), de modo que, aunque el recuento de micrococáceas puede decrecer drásticamente en los primeros estadios de la maduración (Selgas y col., 1988), las lipasas extracelulares liberadas hasta entonces por ellas pueden seguir actuando y atacar así triglicéridos de ácidos grasos de cadena larga, incluso los de 16 y 18 átomos de carbono (Selgas y col., 1986). En cuanto al género *Staphylococcus*, Talon y col. (1992) estudiaron la actividad de dos especies que representan una parte importante de la flora de los embutidos franceses, *S. warneri* y *S. saprophyticus*, concluyendo que podrían estar implicadas en la liberación de ácidos grasos durante el periodo de maduración de los embutidos, especialmente durante los primeros días. Por el contrario *S. xylosus* y *S. carnosus* muestran sólo una ligera actividad lipolítica sobre grasa de cerdo, cordero y vaca y recae sobre triglicéridos de ácidos grasos de cadena corta (Nielsen y Kemner, 1989; Nieto y col., 1989).

Los lactobacilos tienen también la capacidad de producir lipasas. Esta actividad fue demostrada en principio en lactobacilos aislados de queso (Stadhouders y Veringa, 1973; Stadhouders, 1974) y posteriormente en bacterias aisladas de embutidos (Parejo y col., 1979; Sanz y col., 1988), con resultados similares. Estos autores han estudiado diversas cepas de lactobacilos aisladas de embutidos en diferentes estadios de maduración, demostrando en todas ellas actividad lipolítica tanto intracelular como extracelular. Parejo y col. (1979) concluyeron en sus estudios que *Lactobacillus casei* var. *alactosus* y *Lactobacillus plantarum* eran las bacterias que presentaban mayor actividad lipolítica, siendo precisamente los microorganismos más abundantes a lo largo de todo el proceso madurativo. Los sustratos atacados con preferencia por las lipasas extracelulares son los monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos de

ácidos grasos de cadena corta, mientras que las enzimas intracelulares son muy poco activas frente a los triglicéridos. En ambos casos no se observó actividad sobre triglicéridos con ácidos grasos de más de 6 átomos de carbono. A pesar del contenido relativamente bajo de éstos glicéridos en la grasa de los embutidos, su cantidad puede aumentar durante la maduración gracias a la actividad lipolítica tisular y, sobre todo de las micrococáceas (Sanz y col., 1988). Esta actividad proporcionaría compuestos (Demeyer y col., 1974) que podrían ser posteriormente degradados por los lactobacilos.

Muchos mohos (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Mucor*) y levaduras (*Candida*, *Torulopsis*) son también lipolíticos (Kilara, 1985). Así, dentro de la flora fúngica habitual en los embutidos cabe destacar los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* (Leistner y Bem, 1970; Comi y Cantoni, 1980), que de esta forma contribuyen al sabor y aroma, en especial en productos en los que se hallan concentraciones particularmente altas de carbonilos (sobre todo aldehídos de cadena larga) (Langner, 1972).

Las lipasas en general, y las microbianas en particular, pueden dividirse en dos grupos en función de su especificidad posicional. En primer lugar hay lipasas no específicas, que liberan ácidos grasos esterificados en cualquiera de las tres posiciones del glicerol. Pueden, por lo tanto, ocasionar la degradación completa de los triglicéridos a ácidos grasos libres y glicerol. Tal es el caso, por ejemplo, de *Penicillium cyclopium* y *Staphylococcus aureus* (Kilara, 1985). El segundo tipo de lipasas, como las de *Aspergillus niger* o *Pseudomonas fragi* (Kilara, 1985), hidroliza preferentemente los ácidos grasos localizados en las posiciones sn1 y sn3 del glicerol para rendir ácidos grasos libres, monoglicéridos y diglicéridos. Los 2-monoglicéridos y, ocasionalmente, los 1,2- ó 2,3-diglicéridos son inestables y, por migración del grupo acilo se transforman en 1-monoglicéridos y 1,3-diglicéridos (Kilara, 1985). Una actuación prolongada de la enzima en las condiciones óptimas puede llegar a producir la rotura completa del triglicérido en ácidos grasos

libres y glicerol (MacRae, 1983).

Según los estudios de Alford y col. (1971), las lipasas que actúan en los embutidos se caracterizan en su mayor parte por su especificidad por las posiciones de esterificación externas, es decir la Sn 1 y la Sn 3, de la molécula de triglicérido. La acumulación de diglicéridos junto con ácidos grasos libres sugiere además que es atacada preferentemente una de dichas posiciones. Se sabe, además, que los triglicéridos de las grasa de cerdo muestran una distribución característica de los ácidos grasos de forma que la mayor parte del ácido esteárico (en torno al 60%) se encuentra en la posición sn1 del glicerol, el ácido palmítico (60-80%) está esterificado en su mayoría en la sn2 y un 50-60% de los ácidos octadecenoicos se encuentran en la sn3 (Brockerhoff, 1966). De este modo, el grado más intenso de lipólisis debería observarse para los ácidos esteárico y octadecenoicos.

También se han realizado estudios sobre la posible especificidad de las lipasas por la longitud de cadena del ácido graso. Para Sugiura e Isobe (1975) los triglicéridos "sólidos" (aquellos constituidos por ácidos grasos saturados de cadena larga) son hidrolizados lentamente por las lipasas microbianas. No obstante, otros autores (Kilara, 1985) han llegado a la conclusión de que estas enzimas presentan muy poca o ninguna especificidad por ácidos grasos cuando se utilizan como sustratos grasas y aceites naturales comunes, excepto cuando se trata de aceites marinos y/o mantequilla (MacRae, 1983).

En última instancia, la lipólisis conduce a un acúmulo significativo de ácidos grasos libres, sin que se lleguen a apreciar signos de enranciamiento hidrolítico (Nagy y col., 1978; Cavoski y col., 1988). Las tasas que se pueden alcanzar al final del proceso oscilan entre el 1 y 7% según el producto (Demeyer y col., 1974), pudiendo encontrarse niveles elevados de ácidos grasos tanto en embutidos muy secos, resultado de periodos de maduración largos (Stanculescu y col., 1970; Ferrer y Arboix, 1986b) como en productos

de maduración más corta (Wurziger y Ristow, 1966).

#### **I.4.5.4.2.- Fenómenos oxidativos**

**1.- Mecanismo y productos de la oxidación.** El principal problema planteado por la oxidación de los lípidos en los alimentos reside en la formación de compuestos volátiles que, cuando alcanzan unas tasas determinadas, confieren al producto un olor y sabor desagradable, a rancio, siendo rechazado por el consumidor. Por otra parte, los compuestos que surgen primariamente durante las reacciones oxidativas son, a su vez, origen de oxidaciones secundarias de otros compuestos aromáticos, pigmentos, vitaminas y proteínas, determinando la insolubilización de las mismas (Labuza, 1971). Estos cambios influyen decisivamente, y en general de forma desfavorable, en la calidad organoléptica y nutritiva del producto. No obstante, un cierto grado de oxidación puede contribuir beneficiosamente al desarrollo del sabor y aroma característicos de ciertos productos como por ejemplo los jamones y embutidos.

Los sustratos de estas reacciones son básicamente los ácidos grasos insaturados, formándose como productos peróxidos lipídicos (también llamados hidroperóxidos), polímeros, epóxidos, furanos, alcoholes, hidrocarburos y carbonilos (aldehídos y cetonas) volátiles. Entre ellos, los más importantes para el aroma de los productos curados son los carbonilos (Alford y col., 1971; Mottram y col., 1984; García y col., 1991).

La oxidación de los lípidos comprende tres grupos de reacciones que, salvo en su comienzo, se desarrollan simultáneamente (Cheftel y Cheftel, 1980):

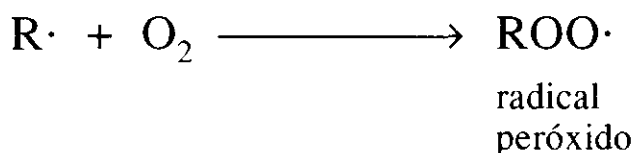
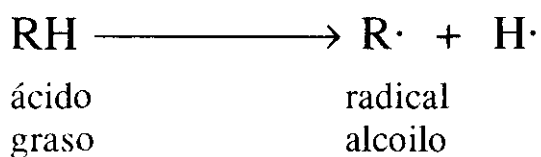
- reacciones de iniciación, que dan lugar a la formación de radicales libres a partir de ácidos grasos insaturados o de hidroperóxidos, que son

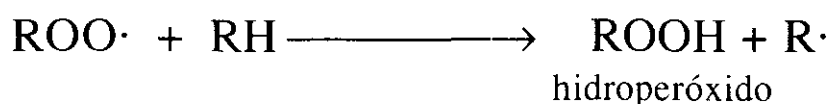
sustancias muy inestables y reactivas.

- reacciones de propagación, que se caracterizan por una cierta acumulación de peróxidos lipídicos. Estas reacciones constituyen la etapa de oxidación de los lípidos insaturados por el oxígeno y necesitan la intervención de radicales libres, pero los crean tanto como los consumen.

- reacciones de paralización, en las cuales los radicales libres, procedentes en gran parte de la descomposición de peróxidos lipídicos, se asocian para dar compuestos no radicales, como aldehídos y cetonas, de bajo peso molecular, responsables del típico olor "a rancio". Algunos de estos compuestos provienen directamente de la degradación de peróxidos.

La oxidación comienza en el ácido graso insaturado con la pérdida de hidrógeno en el átomo de carbono  $\alpha$ -metilénico dando lugar a un radical libre. Este proceso puede estar catalizado, por ejemplo, por la luz o la presencia de metales. El radical libre se combina con oxígeno para formar un radical peróxido, que puede oxidar otro ácido graso insaturado para producir un hidroperóxido insaturado y un nuevo radical libre, de forma que se propague la reacción, que puede terminar por reacción entre los radicales libres para rendir compuestos no activos.

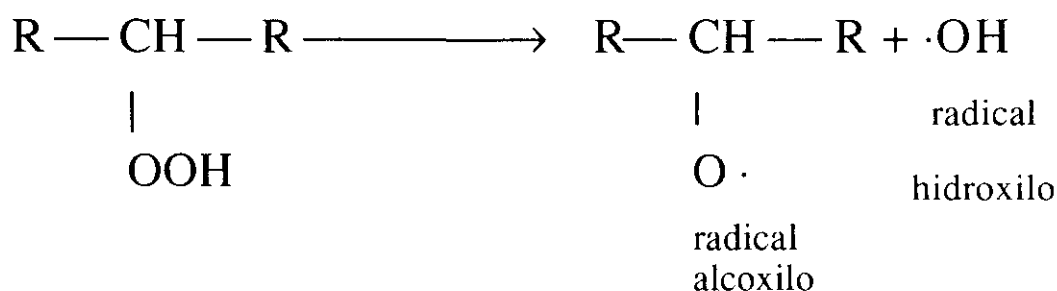




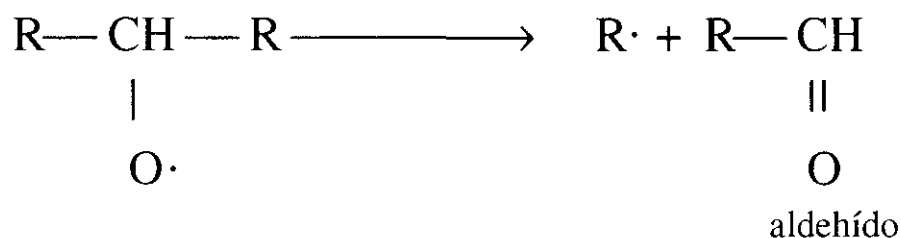
Los hidroperóxidos formados en las reacciones de propagación son los productos primarios de la oxidación. Estos compuestos no tienen repercusión directa en el aroma de los alimentos, pues son inodoros e insípidos, pero sí intervienen en él a través de su descomposición en productos secundarios que son los principales responsables de los cambios organolépticos. Cada ácido graso insaturado da lugar a radicales libres específicos que se estabilizan por resonancia y de los que resultan hidroperóxidos isómeros específicos que, al descomponerse producen también aldehídos específicos (tabla I.4.). El ácido linoleico es el más abundante de los PUFA en la mayoría de los alimentos y el peróxido  $\text{C}_{n-13}$  (13-hidroperoxi-9,11-dieno) es el mayoritario de los que se forman durante su oxidación, por lo que el hexanal es el principal aldehído resultante de la misma. Puesto que este ácido se oxida de 10 a 15 veces más rápido que el ácido oleico, la cantidad de hexanal puede ser un buen indicador del grado de enranciamiento (Buttery y col., 1961; Karel y Labuza, 1968).

Los hidroperóxidos del ácido linolénico se descomponen más rápidamente que los de los ácidos oleico y linoleico debido a la presencia de grupos metileno activos; son los que se localizan entre un doble enlace simple y un grupo dieno conjugado y pueden perder el hidrógeno fácilmente para formar dihidroperóxidos, lo que amplía el abanico de productos de la oxidación (deMan, 1992).

El mecanismo de descomposición de los hidroperóxidos fue esbozado por Keeney (1962). El primer paso es una escisión homolítica rápida, que da lugar a la formación de dos radicales libres muy activos:

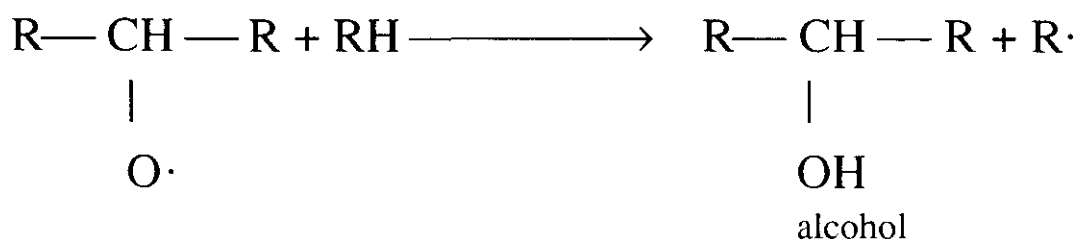


El radical alcoxilo puede sufrir distintas transformaciones. Entre las más interesantes para el desarrollo de componentes aromáticos en los embutidos está la formación de aldehídos, que implica la rotura de la cadena en cualquiera de los lados del radical:

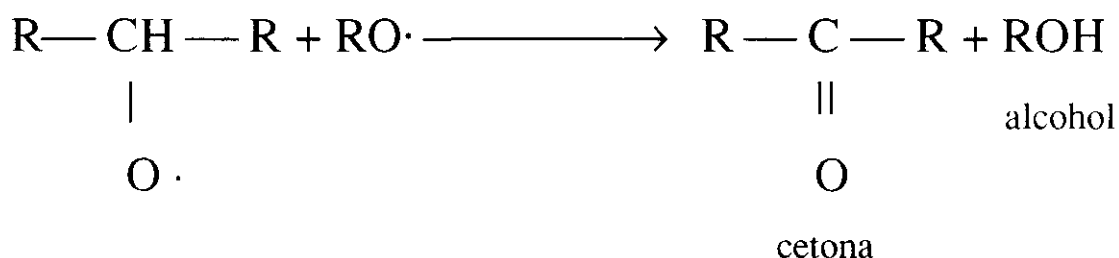
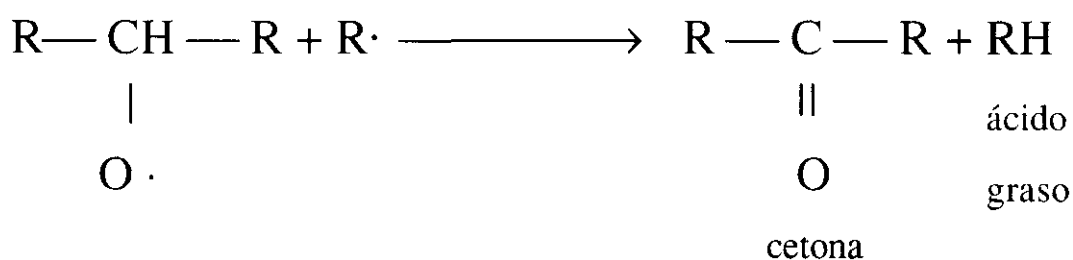


Según el punto de rotura de la cadena se puede formar un aldehído volátil de cadena corta o quedar unido a la parte glicérica de la molécula dando lugar a aldehídoglicéridos no volátiles, que no tienen aroma pero disminuyen la estabilidad de las grasas frente a la oxidación. Los aldehídos volátiles son poderosos componentes del sabor y aroma y tienen un umbral de percepción muy bajo, algunos del orden de p.p.m. (2-decenal, hexanal) y otros, como el 2,4-decadienal, menor de 1 ppb. (deMan, 1992). En general, la presencia de un doble enlace en la molécula de aldehído disminuye de forma considerable dicho umbral.

El radical alcoxilo también puede sustraer un átomo de hidrógeno de otro ácido graso para dar lugar a un alcohol y un nuevo radical libre:



Otra posibilidad es la reacción entre dos radicales libres, finalizando la reacción en cadena y dando lugar a la formación de cetonas:



Los aldehídos, al contrario que las cetonas, pueden oxidarse fácilmente para dar otros productos terciarios de la oxidación, entre ellos los ácidos carboxílicos (Morrison y Boyd, 1985; deMan, 1992). Los aldehídos insaturados son fuente adicional de compuestos volátiles durante la oxidación de los lípidos, entre los que se incluyen, además de los ácidos carboxílicos, aldehídos de peso molecular más bajo y dialdehídos, como el malonaldehído (Frankel, 1982). Los aldehídos saturados son mucho más estables (Schieberle y Grosch, 1981).

Aunque en la carne se encuentran en mucha menor cantidad que los triglicéridos, los fosfolípidos son potencialmente mucho más sensibles a la oxidación (Owen y col., 1975; Wilson y col., 1976). Esto se debe a que tienen

**Tabla I.4.-** Productos específicos de degradación de los ácidos oleico, linoleico y linolénico<sup>a</sup>

Acido graso	Grupo metileno atacado	Producto	
		Hidroperóxidos isómeros	Aldehídos correspondientes
Oleico	11	11-hidroperoxi-9-eno 9-hidroperoxi-10-eno	octanal 2-decenal
	8	8-hidroperoxi-9-eno 10-hidroperoxi-8-eno	2-undecenal nonanal
Linoleico	11	13-hidroperoxi-9,11-dieno	hexanal
		11-hidroperoxi-9,11-dieno	2-octenal
		9-hidroperoxi-10,12-dieno	2,4-decadienal
Linolénico	14	16-hidroperoxi-9,12,14-trieno	propanal
		14-hidroperoxi-9,12,15-trieno	2-pentenal
		12-hidroperoxi-9,13,15-trieno	2,4-heptadienal
	11	13-hidroperoxi-9,11,15-trieno	3-hexenal
		11-hidroperoxi-9,12,15-trieno	2,5-octadienal
		9-hidroperoxi-10,12,15-trieno	2,4,7-decatrienal

<sup>a</sup> Sólo se consideran los grupos metileno más activos

Fuente : deMan (1992)

mayor proporción de ácidos grasos poliénoicos (incluida una mayor cantidad de poliénoicos con más de dos dobles enlaces) que los triglicéridos. Además son más ubicuos en el tejido muscular, ya que se distribuyen en las membranas celulares y subcelulares, lo que les hace presentar una superficie relativamente amplia de exposición y estar en estrecho contacto con catalizadores pro-oxidantes como los metales que forman parte de las hemoproteínas, que se localizan próximas a estas membranas. Por el contrario, los triglicéridos se localizan aislados en el interior de los adipocitos (Kauffman y Stefanie, 1967), con lo que exponen una superficie relativamente pequeña para su ataque.

Por lo general, los ácidos grasos insaturados se oxidan más rápidamente cuando están libres que cuando forman parte de moléculas de triglicéridos o fosfolípidos (Cheftel y Cheftel, 1980). Los PUFA son mucho más susceptibles de oxidación que los monoinsaturados. Dicha susceptibilidad es mayor que la que cabría esperar en función del número de dobles enlaces de la cadena. Así por ejemplo, la razón relativa de autooxidación de metiloleato, linoleato y linolenato a 20 °C es 1:12:25 (Swern, 1964). Los PUFA se oxidan incluso durante el almacenamiento de los alimentos en congelación. Por el contrario, los saturados se oxidan sólo a temperaturas superiores a 60° C (Cheftel y Cheftel, 1980) por lo que su intervención en los fenómenos oxidativos en los embutidos carece, en la práctica, de importancia.

**2.- La oxidación lipídica en los embutidos crudos curados.** La gran variabilidad que se observa en el comportamiento de los alimentos frente a la oxidación de los lípidos se debe a la influencia de diversos factores relacionados con su composición, procesado, etc.

En principio, los productos cárnicos crudos son menos susceptibles a la oxidación que los tratados por el calor, ya que en estos últimos el calentamiento es un importante factor que potencia la reacción oxidativa y

además produce la rotura tisular que favorece el contacto de los lípidos con los agentes catalizadores de estas reacciones (Rhee, 1988). En la carne deshidratada los procesos oxidativos son mucho más lentos que en la carne fresca debido a su menor contenido de agua (Labuza, 1971). No obstante, estos fenómenos están favorecidos en los productos cárnicos por las distintas operaciones de procesado y condiciones de manipulación (picado, refrigeración y congelación repetidas, temperaturas elevadas y almacenamiento prolongado), así como por algunos de los ingredientes añadidos.

El picado de la carne favorece la oxidación al producirse la rotura de las membranas celulares, con lo que en primera instancia los fosfolípidos (ligados a ellas) y también los triglicéridos quedan expuestos al oxígeno atmosférico (Igene y Pearson, 1979; Igene y col., 1980; Khayat y Schwall, 1983). Además, esta operación puede acelerar la pérdida de sustancias intermediarias reductoras como el NAD (Watts y col., 1966; Newbold y Scopes, 1971).

Otra variable relativa al procesado que influye en el grado de oxidación de la grasa de los productos cárnicos es el pH. A medida que su valor desciende por debajo de 7,0, la velocidad de oxidación es mayor (Owen y col., 1975; Yasosky y col., 1984; Tichivangana y Morrissey, 1985). En la carne cruda, cuando el pH es relativamente elevado, la oxidación de los lípidos resulta inhibida por los sistemas enzimáticos reductores presentes en las mitocondrias (Kwoh, 1971). Estos sistemas eliminan el oxígeno y determinan la formación de sustancias reductoras, como el NAD, lo que posibilita el mantenimiento de los pigmentos cárnicos en su forma reducida (Stewart y col., 1965a; b; Saleh y Watts, 1968). En presencia de valores de pH inferiores a 5,5, típicos de los embutidos crudos curados, estos sistemas enzimáticos mitocondriales no tienen actividad (Cheah, 1971).

En relación con la composición, conviene recordar que la carne de cerdo se caracteriza por un alto contenido de fosfolípidos (en torno a un 20%), de los

que el ácido linoleico representa el 30% de los ácidos grasos (Luddy y col., 1970). Además, alrededor del 60% del total de lípidos son ácidos grasos insaturados (tabla I.3). La carne de vacuno presenta un 55% de ácidos grasos insaturados (tabla I.3), pero una menor cantidad de fosfolípidos (en torno a un 4%), por lo que presenta menor importancia en los fenómenos oxidativos.

Un ingrediente característico de los productos cárnicos es el cloruro sódico, que se utiliza por sus efectos favorables sobre las propiedades sensoriales, funcionales e higiénicas, pero es a la vez un importante promotor de la oxidación de los lípidos (Ockerman y León-Crespo, 1981; Rhee y col., 1983a, 1983b). El cloruro potásico, utilizado como sustituto del cloruro sódico en productos (seasonings) con bajo contenido de éste, puede ocasionar una reducción de las reacciones oxidativas (Zipser y col., 1964; Rhee y col., 1983b), aunque su sabor amargo limita su empleo (Rhee, 1988).

El efecto de los nitritos en las propiedades químicas y sensoriales de los productos cárnicos ha sido estudiado por diversos autores (Cho y Bratzler, 1970; Hadden y col., 1975; Cassens y col., 1979) pero aunque se admite que están estrechamente relacionados con el desarrollo del sabor y aroma de estos productos, su mecanismo no se conoce aún claramente. Cho y Bratzler (1970) - en carne de cerdo picada - y Wasserman y Talley (1972) - en salchichas - señalan que en las pruebas sensoriales, los paneles de catadores son capaces de distinguir de forma significativa entre los productos procesados con y sin nitritos. Por su parte Simon y col. (1973) indican que, en salchichas, existe una mayor aceptación por parte de los catadores a medida que se incrementa la cantidad de nitritos añadidos desde 0 a 156 p.p.m.

Respecto al mecanismo de acción de los nitritos en el desarrollo del sabor y aroma de los embutidos, la mayoría de los autores señalan que su principal contribución se debe a su poder antioxidante (Fooladi y col., 1979; Ockerman y Kuo, 1982). Cross y Ziegler (1965) y Bailey y Swain (1973)

llegan a esta conclusión comparando las fracciones volátiles de jamones curados y no curados y observando que ambas son cualitativamente similares, si bien existen importantes diferencias cuantitativas. Hadden y col. (1975) han demostrado que la presencia de nitrito sódico en carne de cerdo picada reduce significativamente los valores de TBA y la cantidad de algunos de los compuestos volátiles mayoritarios en la carne exenta de nitritos.

Las lipasas y fosfolipasas también pueden acelerar la oxidación de los lípidos, al ser los ácidos grasos libres más susceptibles a ella y así, aunque Alford y col. (1971) no han encontrado correlación entre la producción de lipasas y la actividad oxidativa de los microorganismos, algunos autores (Cerise y col., 1973) sugieren que los peróxidos y carbonilos de los embutidos se forman a partir de los ácidos grasos libres (FFA) liberados por la acción de las lipasas. De ser así, la hidrólisis selectiva de los ácidos grasos insaturados puede ser un factor relevante en los fenómenos oxidativos y, por lo tanto, en el sabor y aroma de los embutidos.

La oxidación de los lípidos en la carne cruda está catalizada por sistemas enzimáticos, así como por el hierro "no hemo" (incluido el hierro libre) y el contenido en los pigmentos cárnicos (Rhee, 1992). Además del hierro libre, son también componentes de la fracción "no hemo" del tejido muscular la transferrina, la ferritina y algunos compuestos enzimáticamente activos de la cadena respiratoria mitocondrial. Los compuestos reductores presentes de forma natural en la carne, como la cisteína, o añadidos durante su procesado (ácido ascórbico) y los agentes quelantes (ácido cítrico, aminoácidos, etc) afectan a la actividad del hierro "no hemo" y los demás agentes prooxidantes al proporcionarles un sustrato más susceptible a la oxidación protegiendo así a los pigmentos y a los lípidos (Liu y Watts, 1970; Labuza, 1971).

La participación del hierro en la oxidación de los lípidos de la carne es bien conocida, ya sea en su forma libre o como parte del grupo hemo de la

mioglobina. En este sentido, diversos autores han demostrado su actividad en homogeneizados de carne de distintas especies (Liu, 1970 a, b; Decker y Schanus 1986 a, b). Existen además numerosos estudios (Govindarajan y col., 1977; Verma y col., 1984; Rhee y col., 1986; Rhee, 1987) acerca del importante papel de la mioglobina como catalizador de la oxidación de los lípidos en la carne cruda. Con respecto al mecanismo de actuación, Kanner y Harel (1985) sugirieron la implicación directa de las hemoproteínas (metahemoglobina y metamioglobina) en la oxidación de los lípidos en el tejido muscular. Estudiando la fracción sarcosómica del músculo oscuro de pavo, estos autores observaron que la oxidación lipídica era escasa o nula en presencia de metamioglobina sola o peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) solo, mientras que la interacción del  $H_2O_2$  con la metamioglobina generaba metamioglobina activada, capaz de iniciar rápidamente el proceso. Rhee y col.(1987), en estudios sobre tejido muscular de ternera, sugieren que actúa primariamente la metamioglobina activada y secundariamente el hierro "no hemo" liberado de la metamioglobina por acción del  $H_2O_2$ .

El  $H_2O_2$  en el músculo tiene un origen principalmente no enzimático, presumiblemente a partir de la oxidación de oxihemoglobina y oximioglobina a metahemoglobina y metamioglobina (Wallace y col., 1982; Harel y Kanner, 1985). Puesto que éste es un fenómeno común en la carne procesada tras el corte y especialmente durante el almacenamiento, es razonable pensar que se produce suficiente  $H_2O_2$  para que la metamioglobina activada inicie la oxidación de los lípidos en la carne roja (Rhee, 1988).

En cuanto a la intervención de enzimas, algunos trabajos recientes (Rhee y col., 1984a,b; 1985; Rhee y Ziprin, 1987) han demostrado la existencia de sistemas enzimáticos microsomales en las células que constituyen el músculo esquelético de diversas especies, entre ellas bóvido y cerdo. Asimismo, se han encontrado sistemas similares asociados a las mitocondrias en el músculo de la

trucha (Luo y Hultin, 1986), que presumiblemente también se hallen en el de bóvido y cerdo. Estas enzimas necesitan la intervención de cofactores (NADH y NADPH) y la presencia de ADP y  $Fe^{2+}$  o  $Fe^{3+}$  para su máxima actividad. Su pH óptimo de actuación está en torno a 6,5 (Rhee, 1988), por lo que, en el caso de los embutidos, el sistema puede hallarse inhibido significativamente.

Con todos estos datos Rhee (1988) sugiere que las enzimas y sistemas enzimáticos y posiblemente la metamioglobina activada serían los responsables de la iniciación de la oxidación de los lípidos de la carne fresca, mientras que los catalizadores metálicos (principalmente el hierro libre) participarían aparentemente en la propagación de los radicales libres durante el proceso.

En los productos curados en los que los microorganismos no adquieren importancia (por ejemplo, el jamón serrano) la oxidación corre a cargo principalmente de los sistemas enzimáticos endógenos (Berdagué y col., 1992), mientras que la principal causa de la oxidación de los lípidos en los embutidos es el metabolismo bacteriano, y muy especialmente los peróxidos resultantes de la actividad de lactobacilos y micrococáceas (Demeyer y col., 1974; Burgos, 1981). Estos peróxidos oxidan los ácidos grasos y de esta actividad resulta una acumulación significativa de peróxidos lipídicos y compuestos carbonilos (Wahlroos y Niinivaara, 1969; Alford y col., 1971). Los peróxidos lipídicos, producto de fenómenos no enzimáticos, pueden ser posteriormente metabolizados por las bacterias y transformados en carbonilos y ácidos grasos (Smith y Alford, 1969; Cerise y col., 1973).

En las primeras etapas de la fermentación, los peróxidos sufren un acusado incremento, más precoz que el acúmulo de ácidos grasos libres, para decrecer después a medida que van apareciendo los carbonilos libres, que siguen aumentando incluso cuando los peróxidos acumulados inicialmente desaparecen (Burgos, 1981). Esto no ocurre en los embutidos en los que la tasa de micrococáceas es muy reducida en relación con la de lactobacilos. Según las

experiencias de Smith y Alford (1969), tanto unas como otros son capaces de acelerar la descomposición de los peróxidos lipídicos para originar monocarbonilos, pero sólo algunos micrococos como el *Micrococcus freudenrichi* son capaces de producir estos peróxidos a partir de tocino fresco.

En fase más avanzadas de la maduración se siguen acumulando carbonilos (Cerise y col., 1973; Demeyer y col., 1974) y apenas se detectan peróxidos. Conjuntamente tiene lugar la autooxidación de los ácidos grasos estimulada por la acción prooxidante del cloruro sódico en los lípidos de la carne y el descenso del pH. Los carbonilos de elevado peso molecular de esta procedencia parecen tener una repercusión notable en el aroma y es muy probable que, dada la distinta composición de ácidos grasos de los lípidos de cerdo y bóvido, sean las diferencias en el tipo o cantidad de carbonilos producidos a través de estos mecanismos el factor determinante de las distintas características aromáticas que presentan los embutidos elaborados sólo con cerdo y los que contienen carne de bóvido. Langner y col (1970) y Halvarson (1973) conceden, en cambio, poca importancia a las posibles repercusiones en el aroma de los carbonilos de bajo peso molecular, como el formaldehído, acetaldehído y propanaldehído, resultantes de los procesos heterofermentativos de los carbohidratos (Burgos, 1981).

### **I.5.- RECIENTES AVANCES EN LA TECNOLOGIA DE FABRICACION DE LOS EMBUTIDOS CRUDOS CURADOS**

Como ya se ha señalado anteriormente, hasta hace bien poco la fabricación de embutidos constituía simplemente un método de conservación de la carne, pero hoy en día supone la posibilidad de ofrecer al consumidor una mayor diversidad de productos cárnicos nutritivos y apetecibles. Este cambio de conceptos ha determinado un interés creciente de la ciencia por los aspectos físicos, bioquímicos, microbiológicos y tecnológicos del proceso madurativo de estos productos, cuyo estudio sistemático no se inició hasta el segundo tercio

del siglo XX, y, aunque estos estudios han tenido escasa trascendencia en las técnicas de elaboración (que no han variado en lo esencial), sí que han permitido un control tecnológico de la calidad de estos productos fabricados a nivel industrial, lo que, si bien no logra reproducir la calidad de los embutidos genuinos, gastronómicamente más valiosos, permite evitar numerosos defectos de fabricación (Burgos, 1981) y, en todo caso, conseguir una normalización del producto final que, en definitiva, es una meta deseable para cualquier industria moderna.

El desarrollo de las técnicas de fabricación ha sido hasta fechas recientes básicamente empírico. A lo largo de la historia se fueron desarrollando en las distintas zonas geográficas numerosas variedades de productos que diferían en tamaño, forma, textura, sabor y aroma. Estas diferencias radican principalmente en la composición de la carne, especias, sal, etc. y en el proceso de elaboración fruto del gusto y la habilidad de cada artesano.

La investigación en el campo de la tecnología de los embutidos no ha seguido el mismo ritmo que en el caso de otros productos fermentados como los lácteos. La carne constituye un material mucho más difícil de estudiar que la leche, ya que, en primer lugar, se caracteriza por su falta de homogeneidad. En segundo lugar, es complicado trabajar con cultivos puros de microorganismos, pues resulta poco práctico experimentar con carnes asépticas. La carne cruda contiene habitualmente varios millones de microorganismos por gramo que se encuentran en ella de forma natural y cuya influencia no se puede eliminar ni ignorar (Niinivaara y col., 1964). Por último, no es posible, como ocurre en la leche, pasteurizar la materia prima y sembrar intencionadamente una flora para hacer un seguimiento de los efectos que produce durante la maduración.

La actividad microbiana es indispensable para el desarrollo de las características cualitativas de un embutido. En todos los embutidos, su

estabilidad y consistencia depende en primer término de la transformación de los azúcares en ácido láctico por las bacterias lácticas presentes en la carne (Bacus y Brown, 1981), a las que las condiciones del proceso de fabricación permiten un predominio sobre otros microorganismos no deseables, mientras que el sabor y aroma son resultado de un complejo entramado de reacciones químicas y enzimáticas con una participación muy activa de distintos microorganismos. Hasta la fecha se han aislado y estudiado como posibles iniciadores diferentes tipos de microorganismos presentes de forma natural en los embutidos. El esfuerzo investigador se ha centrado siempre en microorganismos Gram-positivos, pero, algunos autores han sugerido que en el desarrollo del aroma también juegan un papel importante algunas bacterias Gram-negativas (Coretti, 1977; Petäja, 1977a,b; Petäja, 1980).

Según se ha indicado ya en otros apartados de esta memoria, los microorganismos eminentemente productores del sabor y aroma no son fermentativos, por lo que se necesita de la acción conjunta de las bacterias lácticas. La acumulación rápida de ácido láctico inhibe el desarrollo de estos microorganismos no fermentativos, pero un sabor excesivo y un pH elevado en el producto final no son deseables, por lo que para optimizar los efectos de ambos grupos microbianos se ha desarrollado una serie de mecanismos de control tanto en la formulación como en el procesado. Estas innovaciones se refieren fundamentalmente a (Burgos, 1981):

- la aplicación de técnicas de acondicionamiento del aire que permiten un control riguroso de las condiciones ambientales (temperatura, humedad relativa y circulación del aire) durante la fermentación y desecación-maduración.

- la utilización de cultivos iniciadores, ciertos ingredientes químicos (colorantes, aromatizantes, saborizantes, conglutinantes y reguladores del potencial redox) y envolturas sintéticas o semisintéticas que sustituyan a las

tripas naturales.

En relación con con estos avances, la investigación ha seguido dos tendencias diferentes en Europa y Estados Unidos dependiendo de sus prácticas típicas de fabricación (Bacus, 1984; Nychas y Arkoudelos, 1990):

a) Los fabricantes norteamericanos prefieren una fermentación rápida a temperaturas elevadas (entre 28 y 38 °C), lo que determina una mayor acidez en el producto final, con valores de pH de 4,6-5,. En consecuencia, en Estados Unidos el trabajo se ha centrado en el desarrollo de cultivos iniciadores de bacterias lácticas productoras de una acidificación más rápida con el fin de acortar la fase de fermentación (a incluso 6-8 horas) en un amplio rango de temperaturas (21-46 °C), pero manteniendo la calidad higiénica del producto. Se minimiza así el papel de otros microorganismos importantes para el desarrollo del sabor y aroma característicos de estos productos y se centra la diferenciación de los mismos en el contenido de especias y sal y en el control de los parámetros de procesado.

b) Tradicionalmente en la fabricación de los embutidos europeos la pauta de fermentación es más lenta (3-5 días) y se realiza a menor temperatura (en general menos de 24 °C), con lo que se alcanzan valores finales de pH de 5,2-5,6. Así pues, además de en el control de las condiciones ambientales, se ha investigado (Nychas y Arkoudelos, 1990) una amplia gama de microorganismos (micrococos, estafilocococos no patógenos, levaduras, mohos, bacterias Gram-negativas, bacterias lácticas) para conocer su potencial como cultivos iniciadores. En los embutidos europeos la producción de ácido láctico es menor. No obstante, los microorganismos patógenos no presentan problemas dado que las temperaturas utilizadas en la fermentación son bajas.

Los fabricantes europeos llegaron además a la conclusión de que unas condiciones de manipulación extremadamente higiénicas producían una pérdida

del sabor y aroma tradicionales de las carnes curadas, lo que se puede atribuir a la reducción de la microflora natural y a la utilización de nitritos exclusivamente (Puolanne, 1982). La solución de este problema ha sido la utilización parcial de nitratos y de cultivos iniciadores seleccionados.

Como señalan Ordóñez y col. (1993), en la actualidad, y desde un punto de vista comercial, el movimiento de productos alimenticios en la CE y, en general, en el mercado internacional es cada vez mayor. Los países de destino de los productos elaborados son muy exigentes en lo relativo al control de calidad y a la normalización de los mismos, lo que redundará en una competitividad cada vez mayor. Según Ordóñez y col. (1993), la posibilidad de conseguir esta mayor competitividad conlleva el control de una serie de factores, así como la introducción de algunas innovaciones, que, en conjunto podrían resumirse en:

- normalización de la composición química. Partiendo de una materia prima y unos ingredientes de buena calidad y empleando una formulación y una tecnología definidas se puede conseguir una composición química normalizada en los embutidos.

- normalización de la tecnología. Los factores ambientales (temperatura, humedad relativa, circulación del aire, etc.) deben ser controlados, especialmente en las fases críticas, como la fermentación y las primeras etapas de la maduración, ya que van a determinar fenómenos tan importantes como el grado de desecación del embutido y la actividad microbiana en el mismo. Así pues, se hace necesario abandonar los procedimientos de fabricación tradicionales, dejando de confiar en las condiciones climáticas de ciertas regiones geográficas y pasando a utilizar cámaras climatizadas, que permiten regular perfectamente las condiciones ambientales.

- utilización de cultivos iniciadores. El empleo de estos cultivos (de los

que se ha hablado con mayor profundidad en apartados anteriores de esta memoria) en la fabricación de embutidos no está ni mucho menos tan desarrollado como en la industria láctea, pero es de esperar que se vayan introduciendo progresivamente y en un futuro no muy lejano se utilicen regularmente.

- conservación del producto final en el mercado. Puesto que en el producto final no se detienen las actividades enzimáticas y otras reacciones, es necesario establecer unas condiciones apropiadas de almacenamiento, para que su calidad organoléptica no sufra modificaciones importantes. En este sentido, las condiciones ambientales deben de propiciar un enlentecimiento de estas reacciones, lo que se consigue con temperaturas próximas o inferiores a las de maduración, pero sin que se produzca una deshidratación excesiva (caso de utilizar temperaturas de refrigeración y sistemas de ventilación forzada). Hoy en día, es fácil evitar dicha deshidratación excesiva mediante el envasado a vacío o en atmósferas modificadas utilizando películas de muy baja difusión a los gases.

- maduración acelerada de embutidos. El acortamiento del periodo madurativo de los embutidos conlleva un ahorro de instalaciones y la disminución del capital inmovilizado en las fábricas, y por lo tanto, un producto más competitivo. Para conseguir este objetivo se pueden añadir a los embutidos enzimas (proteasas y lipasas) que potencien las actividades degradativas que ocurren en un embutido en maduración y, por lo tanto, la generación de sustancias aromáticas y sápidas. Otra posibilidad sería la adición de pastas semilíquidas a base de embutidos y la enzima elegida para ser añadida como ingrediente. Con ello se conseguiría poner a disposición de los microorganismos una mayor cantidad de sustancias de bajo peso molecular, para su posterior transformación en compuestos aromáticos y sápidos.

- elaboración de productos más "saludables", con menor contenido de

grasa y sal. No obstante, la importancia tecnológica de estos ingredientes (sobre todo el cloruro sódico) crea una serie de limitaciones que reducen bastante las posibilidades de fabricación de estos embutidos.

## **I.5.- JUSTIFICACION DEL TRABAJO**

Todos los avances técnicos anteriormente citados han estado encaminados a hacer más predecibles los fenómenos que ocurren durante la maduración de los embutidos, con el objeto de conseguir la automatización y racionalización de su fabricación industrial, así como la normalización del producto final. Pero, puesto que este proceso es gradual y lento, podría ser interesante intentar acelerarlo. La duración de la maduración es variable según el tipo de embutido, pero, en general, es de uno a tres meses, pudiendo ser, en algunos casos, superior a los seis meses. Obviamente, la reducción de este tiempo es un objetivo deseable, pues supondría una mejor utilización de los locales y equipos, lo que conllevaría una disminución de los costes de fabricación y, en definitiva, una mayor competitividad de estos productos en el mercado.

La bibliografía más abundante que se posee en relación con el uso de enzimas hidrolíticas para acelerar un proceso madurativo se refiere a la elaboración de quesos. Las estrategias que se han utilizado para intentar acelerar los procesos madurativos de estos productos lácteos han sido: maduración a temperaturas elevadas, adición de enzimas, utilización de papillas semilíquidas y adición de cultivos modificados. A continuación se expone brevemente cada una de ellas.

### **I.5.1.- Maduración con temperaturas elevadas**

Este método consiste en la utilización de temperaturas más altas que las empleadas normalmente para la maduración del producto; tiene la ventaja de su simplicidad técnica y la inexistencia de trabas legales que obstaculicen su

aplicación. Sin embargo, su acción no es específica sobre los microorganismos iniciadores, pudiendo favorecer también el crecimiento de especies microbianas no deseables. Este efecto indiscriminado puede ser negativo tanto desde el punto de vista tecnológico como sanitario.

En la fabricación de quesos se han obtenido buenos resultados con este procedimiento. Law y col. (1979) maduraron queso Cheddar a 13 °C durante 24 semanas y comprobaron que este tratamiento proporcionaba un grado de maduración similar al de un queso control mantenido a 6 °C durante 48 semanas. Estos resultados coinciden con los obtenidos por O'Keefe y col. (1979; 1980) y Aston y col. (1983a; 1985).

En el queso es relativamente fácil controlar el crecimiento de los microorganismos no deseables mediante la pasterización de la leche y la aplicación posterior de medidas higiénicas estrictas. Sin embargo, en el caso de los embutidos no se puede, por una parte, someter la masa original a un tratamiento pasterizante y, por otra, no hay que olvidar que la carne cruda contiene siempre un número muy elevado de microorganismos. Este proceder quizá sea útil en el caso de los jamones curados, menos dependientes de las actividades microbianas que los embutidos y más dependientes de reacciones enzimáticas y químicas. De hecho, se ha intentado aplicar estas técnicas a la elaboración de jamón curado, con resultados contradictorios. Skelley y col. (1964) señalaron que se podían obtener jamones muy aceptables manteniéndolos a 18 °C durante 2 semanas y a continuación a 35 °C durante 12 semanas, con resultados similares a los de un proceso de curado a 20 °C durante 12 meses. Por el contrario, Lin y col. (1990a,b) no han tenido éxito con el empleo de temperaturas de maduración elevadas en la curación de jamón.

### **I.5.2.- Utilización de cultivos modificados**

La modificación de los cultivos iniciadores tiene dos vertientes. En una,

las bacterias no se modifican realmente, sino las condiciones de su preparación; con lo que producen más metabolitos que contribuyen a la aparición de los efectos deseados. En el queso, lo habitual es tratar un volumen determinado de leche con una enzima proteolítica, que posteriormente se añade a la materia prima; con ello se liberan péptidos y aminoácidos que estimulan el crecimiento de las bacterias del cultivo iniciador (Vassal y col., 1982).

La segunda posibilidad se refiere a la modificación propiamente dicha de los microorganismos por medios físicos, químicos o genéticos para alterar su actividad metabólica, potenciando algunos enzimas y/o inhibiendo otros. Por ejemplo, las vías metabólicas que producen las sustancias aromáticas y sápidas de los embutidos pueden rendir productos finales no deseados, como dióxido de carbono. Una mínima cantidad de este gas puede ser beneficiosa para la calidad final, pero una producción excesiva puede causar problemas de textura, como la aparición de burbujas o incluso la expansión de la masa. El desarrollo de nuevos cultivos mediante técnicas de ingeniería genética ofrece la posibilidad de eliminar estos efectos no deseados a la vez que se retienen los deseados. Así, en la fabricación de queso una de las modificaciones genéticas consiste básicamente en la utilización de variantes deficientes en la producción de ácido láctico (*lac<sup>-</sup>*) (Law, 1984); la inclusión de gran número de bacterias *lac<sup>-</sup>* (de 2 a 10 veces más que la tasa normal) en los cultivos iniciadores hace que existan bacterias no productoras de ácido láctico que aportan enzimas degradativos a una concentración muy elevada, con lo que se aceleran los fenómenos hidrolíticos y, en consecuencia, el proceso madurativo (Grieve y Dulley, 1983; Aston y col., 1983b). También se han utilizado mutantes de lactobacilos, obtenidos por tratamientos con rayos X, que poseían una mayor actividad proteolítica que las cepas originales. En cualquier caso, las ventajas obtenidas no han sido muy notables (Law, 1984).

En el caso de los iniciadores cárnicos no se ha hecho ninguna investigación al respecto. En el campo de la ingeniería genética sólo cabe

destacar el trabajo de Gotz y col. (1983) con *Staphylococcus carnosus*, especie no patógena, coagulasa-negativa del género *Staphylococcus*, que se utiliza habitualmente como iniciador en la producción de embutidos. Estos autores han investigado la posibilidad de emplear tecnologías de ADN recombinante para el estudio de la organización genética de ciertos estafilococos, pero no -al menos por el momento- con fines de aplicación en la maduración de embutidos.

### **I.5.3.- Adición de pastas semilíquidas**

Este método es el que ha presentado hasta el momento las mayores ventajas para acelerar el desarrollo del sabor y aroma en el queso. Fue introducido por Kristoffersen y col. (1967) y consiste, en esencia, en la preparación aséptica de unas cuajadas con NaCl que se mantienen a 30 °C durante 7 días en recipientes cerrados y posteriormente se añaden a la leche destinada a la fabricación del queso o a la misma cuajada. Von Bockleman y Lodin (1974) han atribuido la aceleración del proceso madurativo a que la pasta semilíquida contiene elevadas tasas de lactobacilos. El mayor inconveniente que tiene este método es la dificultad de controlar la flora microbiana de la pasta, pues la temperatura de 30 °C favorece el crecimiento de ciertos microorganismos no deseables. En embutidos, no existe, que la autora sepa, referencia alguna al respecto.

### **I.5.4.- Adición de enzimas**

De todos los métodos posibles de aceleración de la maduración, éste ha sido el más investigado. La finalidad de este método es acortar el proceso madurativo sin que se produzcan pérdidas de sabor y aroma (Gatfield, 1988). Las primeras experiencias con adición de enzimas a la cuajada fueron realizadas por Iwasaki y Kosikowski (1973), quienes utilizaron 41 enzimas entre los que se encontraban proteasas ácidas y neutras, descarboxilasas, lipasas

y lactasas. Estos autores obtuvieron resultados bastante satisfactorios en el queso Cheddar siempre que no se superasen determinadas proporciones de enzima. Desde entonces han sido numerosos los trabajos realizados en diferentes tipos de quesos, siempre con las enzimas (lactasas, proteasas y lipasas) que actúan sobre los componentes mayoritarios de la leche. Considerando estos antecedentes, las enzimas más interesantes en la aceleración de la maduración de los embutidos serían las proteasas y lipasas.

La adición de enzimas es un método relativamente barato, presenta acción específica sobre los precursores de los componentes aromáticos y sápidos de interés y ofrece la posibilidad de elegir una determinada enzima para producir un efecto definido. Pero todavía se presentan algunos inconvenientes asociados a su empleo rutinario, tales como las escasas fuentes de enzimas útiles para este fin, el riesgo de producir una sobremaduración del producto y las limitaciones legales existentes en algunos países.

El principal problema tecnológico que plantea la utilización de enzimas en la fabricación de queso es su solubilidad, ya que una gran parte se pierde con el suero. Esta pérdida no puede ocurrir en los embutidos, pues la totalidad de los ingredientes añadidos en la formulación, incluidas las enzimas, se embuten conjuntamente.

#### **I.5.4.1.- Proteasas**

Para acelerar los fenómenos proteolíticos en el queso se han utilizado distintas proteasas, en su mayoría microbianas, de varios orígenes: estreptococos lácticos y no lácticos, *Bacillus* sp., mohos (gén. *Aspergillus* y *Penicillium* ), etc. La mayoría de los ensayos se han realizado en queso Cheddar y quesos egipcios.

En líneas generales la aceleración de la proteólisis en el queso suele

determinar la aparición de defectos en el sabor y/o en la textura. En relación con aquél, se presentan a menudo sabores extraños, sobre todo amargos, derivados de la rápida e intensa acumulación de péptidos hidrófobos de tamaño mediano por hidrólisis de las caseínas. En cuanto a la textura, el defecto típico que aparece es la fragilidad y debilidad de la masa debida a la excesiva hidrólisis de las caseínas, soporte estructural del queso (Law y Wigmore, 1982 a,b; 1983).

La pronasa E es una mezcla de proteinasas, amino- y carboxipeptidasas (Belitz y Grosch, 1987) producida por *Streptomyces griseus*. La adición de esta enzima al queso produce un fuerte sabor y un relativamente escaso sabor amargo en comparación con otras proteasas (Law y Wigmore, 1982b). Eilberg y Liepe (1977) señalaron que la utilización del microorganismo como cultivo iniciador en la elaboración de embutidos mejora el color y el sabor de los mismos, si bien no es habitual su empleo a nivel industrial. Díaz y col. (1993) concluyen a través de sus experiencias con dicho enzima que puede ser útil en la aceleración de los fenómenos proteolíticos de los embutidos siempre que no se superen ciertas concentraciones que determinan un ablandamiento excesivo en el producto final.

De todos modos, Law (1991) observa que la clave para acelerar la maduración de los quesos es el control equilibrado de la proteolisis y éste es también aplicable a los embutidos. En este control pueden tener importancia las condiciones físicas que se establecen durante el proceso madurativo. Por ejemplo la proteasa neutra de *Bacillus subtilis* tiene la ventaja de que su actividad se desvía bastante del punto óptimo en las condiciones imperantes en el queso maduro (es muy poco activa por debajo de 8°C) (Law y Wigmore, 1982 b) con lo que se evita el riesgo de la sobremaduración.

#### **I.5.4.2.- Lipasas**

Teniendo en cuenta la importancia de los fenómenos lipolíticos en el desarrollo del sabor y aroma de los embutidos, es lógico pretender potenciar estas reacciones añadiendo las enzimas responsables de los mismos.

La utilización de lipasas en el proceso de fabricación de algunos alimentos no es una técnica completamente nueva. En Italia, tradicionalmente, se añaden estas enzimas a la leche junto con el cuajo para la elaboración de quesos de sabor fuerte tipo Grana, Provolone y Parmesano (Botazzi, 1965). Pero, aunque estos quesos se fabrican tradicionalmente así, su sabor puede ser acentuado aún más añadiendo lipasas comerciales al cuajo (Bottazzi, 1965; Moskowitz, 1980), si bien la solubilidad de las lipasas implicaría una gran pérdida de las mismas en el momento del desuerado.

Las fuentes de estas enzimas son variadas. Se pueden encontrar lipasas en diversos tejidos y fluidos animales (páncreas y jugo pancreático, sangre, plasma, saliva, leche, etc.), en ciertas semillas oleaginosas (soja, girasol, etc.) y en distintos microorganismos (hongos y bacterias). Las lipasas vegetales no han tenido prácticamente hasta el momento aplicación comercial, pero las microbianas y las de origen animal han sido utilizadas con buenos resultados en la fabricación de distintos productos.

La aceleración de la lipólisis mediante la adición de lipasas de distinto origen ha sido ensayada, además de en quesos italianos, en el queso azul (Jolly y Kosikowski, 1975), quesos egipcios (El-Salim, 1978; El Neshewy y col., 1983; 1984), búlgaros (Rachev y Panova, 1980) y Cheddar americano (Sood y Kosikowski, 1979a). También se han utilizado lipasas para modificar la composición de distintas grasas y aceites como, por ejemplo, la fosfolipasa pancreática porcina A en la preparación de aceite de pescado enriquecido en ciertos ácidos grasos (Tocher y col., 1986) o en la interesterificación de

grasas de otro origen para producir sucedáneos de manteca de cacao (Coleman y Mac Rae, 1980).

Un punto esencial que hay que tener presente en relación con el objetivo pretendido es la especificidad de las lipasas. Así por ejemplo, la grasa láctea sometida a lipólisis con enzimas microbianos da lugar a la acumulación de distintos tipos y cantidades de ácidos grasos libres (Shahani y col., 1976). Según estos autores, la lipasa de *Achromobacter lipolyticum* libera muy selectivamente ácido linoleico, la de *Geotrichum candidum* libera también de forma muy selectiva ácido linoleico o ácido oleico en mayor medida que la de *Achromobacter lipolyticum*, mientras que la de *Aspergillus niger* hidroliza con preferencia el ácido esteárico. Como el perfil de ácidos grasos varía significativamente según la lipasa utilizada y puesto que el tipo y cantidad de ácidos grasos determina en gran medida el sabor y aroma de un producto, será muy importante elegir adecuadamente el enzima a utilizar (Kilara, 1985).

Partiendo de los conocimientos que se poseen sobre el uso de enzimas para acelerar el proceso madurativo del queso y teniendo en cuenta la importancia de los procesos enzimáticos (microbianos y no microbianos) en el desarrollo de las propiedades sensoriales de los embutidos crudos curados, parece lógico intentar acelerar su maduración incrementando artificialmente la concentración de algunos de los enzimas que juegan un papel fundamental en dichos procesos.

Tomando esta hipótesis como base se solicitó en la convocatoria de 1988 una subvención a la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT), concedida con fecha 15 de noviembre de 1988. El objetivo final era investigar la posibilidad de acelerar o potenciar el sabor y aroma de los embutidos mediante la adición de enzimas. El proyecto se dividió en dos subproyectos; en uno se pretendía estudiar la utilidad de las proteasas en dicho sentido, y, en el otro, la de las lipasas. Los resultados obtenidos se recogen en

dos tesis doctorales: los referentes a la adición de proteasas en la tesis de la que es autora la Lda. Olga Díaz Rubio, y los de las lipasas, en la presente memoria.

Cuando se ideó el proyecto de investigación antes citado, no existía en la bibliografía trabajo alguno que se refiriera a la utilización de enzimas hidrolíticos para acelerar el proceso madurativo de los embutidos o para la potenciación de su sabor y aroma. Sin embargo, durante el desarrollo del trabajo experimental del proyecto, se presentó una comunicación al 38th ICOMST, en la que se estudiaba el efecto de la adición de una proteasa de *Lactobacillus paracasei* subs. *paracasei* y una lipasa de *Lactobacillus plantarum* MF32 en la maduración de embutidos (Naes y col., 1992). En relación con la proteasa, estos autores observaron que la adición de esta enzima a los embutidos determinaba un rápido descenso del pH y una acusada degradación proteica, que alcanzaba en 2 ó 3 días los mismos niveles que unos embutidos control al cabo de 42 días de climatización. Por eso Naes y col (1992) sugieren su posible aplicación para la aceleración del proceso madurativo de los embutidos.

Cuando Naes y col. (1992) añadieron a los embutidos la lipasa de *Lactobacillus plantarum* MF32, observaron que se producía un notable acúmulo de ácidos grasos insaturados (como cabría esperar en función de su especificidad por las posiciones externas de los triglicéridos), que quedarían disponibles para sufrir posteriores transformaciones en carbonilos, alcoholes, etc. Estos son los únicos datos que existen, que la autora sepa, sobre el empleo de enzimas para acelerar o potenciar el desarrollo del sabor y aroma de los embutidos crudos curados.

Se eligió la lipasa pancreática debido a que esta enzima es la mejor conocida y, dado que su actividad óptima se desarrolla a pH 7-8, se pensó que con los valores de pH que se registran normalmente en los embutidos tras la fermentación, su actividad quedaría reducida de una forma importante y, en

consecuencia, no actuaría de forma notable más que en la masa en los primeros momentos de la fase fermentativa.

La lipasa pancreática se produce en las células acinares del páncreas, siendo a continuación liberada en el duodeno, donde facilita la digestión y absorción de los lípidos. Tiene un peso molecular de 42.000 y presenta, como la mayor parte de las lipasas animales y microbianas, su pH óptimo de actuación en la zona alcalina (8-9), aunque, dependiendo del sustrato y la presencia de sales y agentes emulsionantes, puede virar hacia pH ácidos (Wills, 1965). Su temperatura óptima es 30-40 °C. La presencia de concentraciones de cloruro sódico superiores a 7mM aumentan la actividad de la lipasa pancreática porcina (Kilara, 1985) al igual que la presencia de calcio, que incrementa el grado de hidrólisis de los triglicéridos, particularmente hacia el final del proceso.

El sustrato sobre el que actúa con preferencia son los ésteres del glicerol en emulsión e hidroliza más intensamente los triglicéridos, a continuación los diglicéridos y más débilmente los monoglicéridos. Al igual que muchas lipasas microbianas, presenta especificidad por las posiciones de esterificación primarias del glicerol, es decir, libera más rápidamente los ácidos grasos esterificados en las posiciones sn1 y sn3 que los que se encuentran en la sn2 (Kilara, 1985). Sin embargo, la lipasa pancreática porcina no tiene especificidad absoluta por los ésteres del glicerol, sino que también puede hidrolizar ésteres metílicos y, así, la velocidad de hidrólisis de la tributirina es sólo tres veces mayor que la del metilbutirato.

Se cree que la longitud de cadena de los ácidos grasos influye de alguna manera en la actividad hidrolítica de la lipasa pancreática, que tiene mayor actividad frente a triglicéridos esterificados con ácidos grasos de cadena corta que de cadena larga, presentando la máxima intensidad con tripropionina y tributirina y un menor efecto sobre los ácidos grasos de más de 10 átomos de

carbono. En cualquier caso, sólo existen diferencias moderadas en cuanto a la intensidad de hidrólisis de distintos ésteres de ácidos grasos de cadena larga tanto saturados como insaturados (Kilara, 1985).

Puesto que, por definición, las lipasas actúan en las interfases lípido-agua, cualquier condición que incremente la superficie de contacto sustrato-agua, incrementará la actividad de la enzima. Así, su acción es mucho más rápida en productos emulsionados, como la leche homogeneizada (Whitaker, 1972) o en los productos cárnicos picados.

---

*CAPITULO II*  
*MATERIAL Y METODOS*

---

## **II.1.- MATERIAL GENERAL**

### **II.1.1.- MATERIAL BIOLÓGICO**

En la realización de este trabajo se han utilizado salchichones a los que se añadieron distintas concentraciones de lipasa pancreática. Su elaboración se realizó en una planta piloto cedida por una industria local (Industrias Cabo S.A.), tras lo cual fueron transportados al laboratorio para su maduración controlada.

### **II.1.2.- MATERIAL GENERAL DE LABORATORIO**

La maduración de los embutidos se realizó en una cámara climática "Kowell" mod. CC3AFY provista de regulador programable de temperatura y humedad y un registrador "Sekonic" mod. SD-H50. (1)

Las muestras y sus extractos se conservaron en arcones de congelación "Kelvinator" mod. ACK-55 y "Liebherr", así como en frigoríficos "Philco" y "Fagor" y cámaras frigoríficas y de congelación "Frikey" construidas para tal fin por un proveedor local.

Todas las disoluciones acuosas empleadas se prepararon en agua destilada que se obtuvo en un aparato "Pobel" mod. 706.

Las pesadas ordinarias se realizaron en balanzas monoplato "AND" mod. EK-1200 A y las pesadas de precisión en balanzas analíticas "Sartorius" mod. 2443.

(1) *La cita de marcas de aparatos, reactivos, etc. no significa que la autora las recomiende con preferencia a otras marcas del mercado.*

Los pHmetros utilizados fueron "Radiometer" mod. 28 y "Crison" mod. 2001.

La actividad de agua se determinó en un aparato "Decagon" mod. CX1, basado en la medida del punto de rocío.

La homogeneización de las muestras se llevó a cabo con ayuda de homogeneizadores "Polytron" mod. PTA/20TS y "Calworth" mod. Stomacher 400.

Para la desecación de las muestras y en la activación de los soportes cromatográficos se utilizaron estufas "Heraeus" mod. T 6200 y KTFU-K.

Las esterilizaciones se realizaron en autoclaves "Selecta" mod. Autester G y 43-G .

Para las incubaciones microbiológicas se utilizaron estufas "Heraeus" mod. B 6200 termostatadas a 32°C.

Las centrifugaciones se llevaron a cabo en centrífugas "Sorvall" RC-5B equipadas con rotores GSA y HS-4 y "Martin Christ" mod. UJ3.

Las determinaciones colorimétricas y espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro UV-VIS "Hitachi" mod. U-2000 de doble haz.

La concentración de volúmenes de disolventes orgánicos relativamente grandes se efectuó en un rotavapor "Büchi" mod. EL, acoplado a un baño maría y conectado a una trompa de agua para conseguir una presión de vacío adecuada. Otros sistemas de vacío utilizados fueron bombas eléctricas "Eyela" mod. A3-S.

Los volúmenes pequeños de disolventes orgánicos (menos de 25 ml) se eliminaron total o parcialmente mediante corriente de nitrógeno.

Las liofilizaciones se realizaron en un aparato Teruzzi-Mevilsa mod. TP-3 con superficie útil de carga de 0,3 m<sup>2</sup>. dotado de equipo de registro, dispositivo de termovacío y programador.

La cromatografía en capa fina (TLC) se llevó a cabo en cromatoplasmas "Merck", utilizando para su desarrollo cubetas "Desaga". La lectura de las placas una vez desarrolladas y reveladas se realizó en un densitómetro "Shimadzu" mod. CS-9000.

Para la cromatografía en fase gaseosa (GC) se empleó un cromatógrafo "Perkin-Elmer" mod. 8420 provisto de inyector split/splitless de vaporización con temperatura programable (PTV), programador de temperatura del horno, detector de ionización de llama (FID) y conectado a una impresora "Perkin-Elmer" mod. GP-100.

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) se realizó en un aparato "Waters" mod. 600 provisto de un inyector "Waters" mod. U6K y de un detector fotodiodo "Waters" mod. 990, conectado a un ordenador "NEC" mod. APC III y a una impresora "Waters" mod. 990.

Las columnas cromatográficas utilizadas fueron suministradas por "J & W Scientific", "Phase Sep" y "Waters".

Las microjeringas empleadas fueron de 1 , 5 y 10 µl de las firmas "SGE" y "Hamilton".

La filtración de las muestras se efectuó a través de diversos modelos de filtros "Whatman".

Se utilizaron pipetas y micropipetas automáticas de las marcas "Brand" mod. D-6980 y "HTL" mod. V-20, V-200 y V-1000 para dispensar volúmenes de 5 ml, 0-20  $\mu$ l, 20-200  $\mu$ l y 1 ml, respectivamente.

El material general de vidrio fue suministrado por "Pobel", "Afora" y "Alamo".

También se han utilizado en el desarrollo de este trabajo otros equipos de uso general como: refrigerantes, baños de calentamiento, contadores de colonias, agitadores, mecheros Bünsen, frascos lavadores de gases, desecadores de vidrio, etc.

## **II.2.- PRODUCTOS QUÍMICOS**

### **II.2.1.- REACTIVOS**

Todos los productos químicos utilizados en las experiencias que se describen eran de calidad reactivo y fueron suministrados por "Merck", "Panreac" y "Probus".

La enzima utilizada para este trabajo fue lipasa pancreática (Triacylglicerol lipase E.C. 3.1.1.3) cruda tipo II (esteapsina) extraída de páncreas porcino, con una riqueza del 25%, de "Sigma". Según las indicaciones de la casa suministradora, este extracto enzimático, contenía además una cierta actividad proteolítica y amilolítica. Dada su posible repercusión en las características sensoriales de los embutidos, la actividad proteolítica del extracto se determinó utilizando azocaseína como sustrato.

Los productos utilizados en las experiencias microbiológicas fueron suministrados por "Oxoid" ("Unipath").

## II.2.2.- DISOLVENTES Y PURIFICACION DE LOS MISMOS

Los disolventes utilizados en las extracciones y cromatografías fueron: cloroformo, metanol, etanol, éter etílico, éter de petróleo 50°-70°C y hexano, suministrados por "Merck" y "Panreac" y acetona, de "Scharlau".

Todos los disolventes (incluso los de alta pureza analítica) contienen siempre impurezas, aún a nivel de trazas. La utilización de grandes cantidades de disolventes para la obtención, en algunos casos, de pequeñas cantidades de lípidos puede ocasionar serias contaminaciones en las muestras. Por ello, los disolventes de los que se utilizaron grandes volúmenes fueron redestilados en el laboratorio.

El cloroformo se purificó por destilación fraccionada, utilizando una columna de rectificación de Vigreux y eliminando, como es normal, las fracciones de cabeza y cola.

El éter etílico se deshidrató por adición de alambre de sodio preparado por extrusión en una prensa. Antes de su utilización se procedió a su destilación con polvo de hierro reducido para liberarlo de peróxidos.

La acetona se destiló siguiendo el método descrito por Faure (1954): se añadieron unos gramos de  $\text{KMnO}_4$  hasta que la acetona adquirió un color violeta persistente; posteriormente se hirvió a reflujo hasta que el color tornó a marrón oscuro y se dejó reposar la mezcla 10-12 horas. El agua contaminante se eliminó mediante la adición de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  anhidro y seguidamente se filtró a través de una placa de vidrio de porosidad 2. Finalmente se realizó su destilación fraccionada.

El hexano se destiló por ebullición a reflujo durante 3 horas en un baño

de arena añadiendo 1g de  $\text{NaBH}_4$  por cada litro de disolvente. A continuación se filtró a través de papel "Whatman" nº 4.

Los disolventes que no se sometieron a destilación (etanol, metanol y éter de petróleo) eran de calidad analítica y fueron suministrados por "Merck".

### **II.2.3.- SOPORTES CROMATOGRAFICOS**

#### **II.2.3.1.- Cromatografía en capa fina (TLC)**

Se realizó en cromatoplasas "Merck" de gel de sílice G 60 de 20 x 20 cm y 10 x 20 cm, con un espesor de capa de 0,25 mm.

#### **II.2.3.2.- Cromatografía en fase gaseosa (GC)**

Para la identificación y cuantificación de los ácidos grasos de cadena corta se utilizó una columna suministrada por "Phase Sep" en sílice fundida de 30 m de longitud y 0,53 mm de diámetro interno, empaquetada con DB-FFAP (polietilenglicol acidificado) como fase estacionaria con un espesor de 1,0  $\mu\text{m}$ .

Para la identificación y cuantificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos libres se empleó una columna "J & W Scientific" de 30 m de longitud y 0,25 mm de diámetro interno en sílice fundida. La fase estacionaria era DB-225 (50% de metilcianopropilo y 50% de metilfenilsilicona) con un espesor de capa de 0,15  $\mu\text{m}$ .

#### **II.2.3.3.- Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)**

Para la identificación y cuantificación de las 2,4 dinitrofenilhidrazonas derivadas de los aldehídos se utilizó una columna "Waters" "Nova Pak" C18

(ODS ligado a sílice amorfa, 4  $\mu\text{m}$ ) de 15 cm de longitud y 3,9 mm de diámetro interno.

#### **II.2.4.- PATRONES**

Los patrones empleados para la identificación de los ácidos grasos de cadena corta fueron suministrados por "Fluka" y "BDH".

Los patrones de los ésteres metílicos de los distintos ácidos grasos, así como los utilizados en la cromatografía en capa fina (ácidos grasos libres, mono, di y triglicéridos y colesterol) fueron de "Sigma".

Los patrones utilizados para la identificación de los aldehídos fueron de "Aldrich", "Sigma", "Fluka", "Scharlau" y "Jansen".

#### **II.2.5.- GASES**

Para la eliminación de pequeñas cantidades de disolventes orgánicos se utilizó nitrógeno de calidad industrial suministrado por la Sociedad Española del Oxígeno (S.E.O.).

Los gases utilizados para la cromatografía en fase gaseosa fueron: nitrógeno calidad N-48, hidrógeno calidad N-50, helio calidad N-50 y aire sintético puro, todos ellos de alto grado de pureza e igualmente procedentes de la S.E.O.

### **II.3.- METODOLOGIA**

#### **II.3.1.- PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS**

Los embutidos experimentales fueron fabricados en una planta piloto

cedida por "Industrias Cabo, S.A." de Madrid, siguiendo la técnica utilizada a nivel industrial. La maduración o secado se efectuó en una cámara climática (cuya descripción figura en el apartado II.1.2) programada con condiciones similares a las utilizadas en dicha fábrica para este mismo tipo de productos.

### **II.3.1.1.- Composición de los embutidos**

La mezcla inicial de ingredientes contenía (% p/p):

- Carne magra de cerdo . . . . .	55%
- Carne magra de vaca . . . . .	12%
- Tocino . . . . .	25%
- Cloruro sódico (NaCl) . . . . .	2,5%
- Nitrato sódico (NaNO <sub>3</sub> ). . . . .	0,0095%
- Nitrito sódico (NaNO <sub>2</sub> ) . . . . .	0,0065%
- Ascorbato sódico . . . . .	0,046%
- Glutamato sódico . . . . .	0,25%
- Lactosa . . . . .	1%
- Glucosa. . . . .	0,8%
- Dextrina . . . . .	1,4%
- Pimienta negra . . . . .	0,14%
- Agua . . . . .	1,5%

### **II.3.1.2.- Fabricación de los embutidos**

La carne fue triturada en una picadora "Cutter" hasta conseguir un grosor de grano medio (5 mm) y, una vez añadidos los aditivos se mezcló todo en una amasadora. La masa resultante se mantuvo a 8°C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se añadió la lipasa pancreática, diluida en 200 ml de agua destilada a los lotes correspondientes y se volvió a mezclar.

Inmediatamente después se procedió al embutido en tripas artificiales de colágeno de 4 cm de diámetro, obteniéndose salchichones de 15-20 cm de longitud.

Siguiendo esta pauta de trabajo, se elaboraron 9 lotes de embutidos, cada uno de ellos de unos 14 Kg. Cada lote se dividió en dos mitades: una que se utilizó como control y otra a la que se añadió lipasa pancreática. Las cantidades de enzima utilizadas fueron: 3, 10, 30, 40, 60, 90, 180, 250 y 500 unidades. La unidad de actividad lipásica se definió como "la cantidad de enzima que hidroliza 1 miliequivalente de ácido graso a partir de aceite de oliva en 1 hora a 37°C y pH 7,7".

Finalizada la operación de embutido, los distintos lotes fueron trasladados al laboratorio para su maduración. Esta se realizó en la cámara climática descrita en el apartado II.1.2, en condiciones de humedad relativa y temperatura perfectamente controladas. Así, los salchichones se mantuvieron en una primera fase a 22°C y 90% de humedad durante 12 horas. En las 60 horas siguientes se redujo paulatinamente la humedad a un 80% y la temperatura a 18°C y una vez concluida la fase de fermentación, se fijaron valores de 75% de humedad y 12°C de temperatura, condiciones que se mantuvieron hasta el final de la maduración, que duró entre 14 y 28 días según los lotes. En la figura II.1 se puede observar más detalladamente el programa de maduración utilizado. Los periodos madurativos de los distintos lotes fueron:

- lote 3 (control y 3 unidades de lipasa pancreática): 28 días.
- lote 10 (control y 10 unidades de lipasa pancreática): 14 días.
- lote 30 (control y 30 unidades de lipasa pancreática): 14 días.
- lote 40 (control y 40 unidades de lipasa pancreática): 14 días.
- lote 60 (control y 60 unidades de lipasa pancreática): 14 días.
- lote 90 (control y 90 unidades de lipasa pancreática): 28 días.

- lote 180 (control y 180 unidades de lipasa pancreática): 28 días.
- lote 250 (control y 250 unidades de lipasa pancreática): 28 días.
- lote 500 (control y 500 unidades de lipasa pancreática): 28 días.

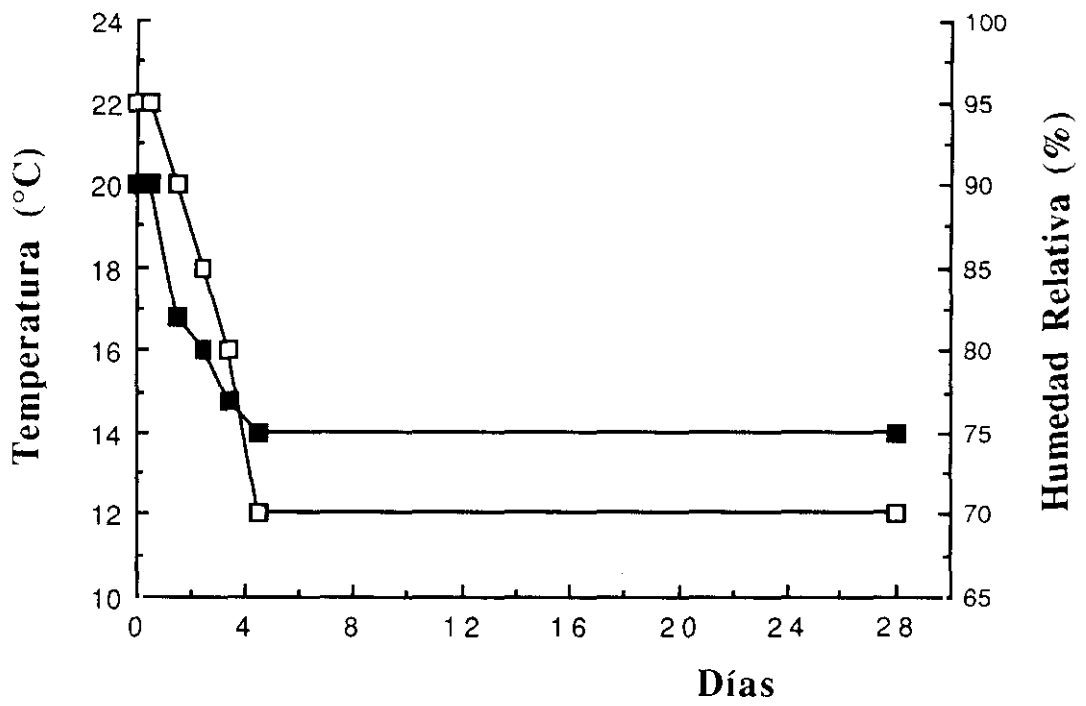
Este fue el orden cronológico de fabricación de los distintos lotes. El tiempo de maduración, la concentración de enzima añadida o ambas cosas se fueron variando de acuerdo con los resultados obtenidos en los embutidos previamente analizados.

### **II.3.1.3.- Toma de muestras**

Además del día 0 de maduración, correspondiente a la masa sin embutir, la toma de muestras en cada lote se realizó los siguientes días:

- lotes 1, 6 y 7: días 2, 6, 12, 19 y 28.
- lotes 2 y 3: días 2, 6, 8 y 14.
- lotes 4 y 5: días 2, 6, 10 y 14.
- lotes 8 y 9: días 2, 6, 14 y 28.

En todos los casos se tomaron como muestra dos salchichones, de los que se procedió a separar la tripa y pesar las cantidades necesarias para las distintas pruebas bioquímicas, que fueron conservadas en arcones de congelación a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la realización de los análisis. Para las determinaciones microbiológicas, las muestras, de 10 g de salchichón, se recogieron en condiciones de esterilidad.



**Figura II.1.-** Programa utilizado para la maduración de los embutidos experimentales.(□ ) Temperatura, ( ■ ) Humedad relativa.

## II.3.2.- METODOS MICROBIOLÓGICOS

### II.3.2.1.- Preparación de las muestras

Se homogeneizaron en un "Stomacher" 10 g de salchichón en 90 ml de agua de peptona estéril en una bolsa estéril durante 5 min. De este homogeneizado (dilución  $10^{-1}$ ) se tomó 1 ml, que se transfirió a un tubo con 9 ml de agua de peptona para obtener la dilución  $10^{-2}$ . Las diluciones sucesivas se prepararon siguiendo la misma pauta.

### II.3.2.2.- Medios de cultivo utilizados

- ágar para recuento en placa (PCA) al que se añadió un 1% de NaCl de acuerdo con las recomendaciones de Dainty y col. (1975), para el recuento de viables totales en productos cárnicos.

- ágar manitol-sal (MSA) para el recuento de micrococáceas.

- ágar MRS (de Man, Rogosa y Sharpe) ajustado a pH 5,6 para el recuento de la flora láctica (Man y col., 1960).

Para la obtención de las diluciones a partir de las muestras se utilizó agua de peptona al 1% con un 8,5 ‰ de NaCl.

Todos los medios se prepararon siguiendo las instrucciones de la casa suministradora (Oxoid). Se ajustaron al pH correspondiente y se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 20 min.

### II.3.2.3.- Realización de los recuentos

Se llevó a cabo por el método de dilución en placa y las siembras

siempre se hicieron por duplicado.

Las siembras en PCA y MSA se hicieron en una capa, depositando primero en la placa 1 ml de las diluciones preparadas de acuerdo con el número de microorganismos viables esperado y añadiendo a continuación una capa de 15-20 ml de agar. Las placas se agitaron suavemente para favorecer una distribución homogénea de las colonias. Las siembras en MRS se realizaron en doble capa (añadiendo una segunda capa una vez solidificada la primera) dado el carácter microaerófilo de la flora láctica.

Una vez solidificados los medios, las placas se incubaron en posición invertida en estufa a 32 °C durante 2-3 días transcurridos los cuales se efectuó el recuento de las colonias con un contador provisto de registrador. Sólo se tuvieron en cuenta las placas que contenían entre 30 y 300 colonias. Los resultados se expresaron por gramo de embutido.

### **II.3.3.- METODOS FISICOS, QUIMICOS Y SENSORIALES**

#### **II.3.3.1.- Determinación del contenido de humedad**

Se siguió el método 950.46 B de la A.O.A.C., para lo cual se partió de muestras de aproximadamente 3 g que se pesaron en una balanza de precisión de  $\pm 0,1$  mg y se desecaron en estufa a 110 °C hasta alcanzar peso constante. Para realizar las pesadas de las muestras procedentes de estufa se enfriaron previamente aquéllas hasta la temperatura ambiente en un desecador de vidrio.

El contenido en agua se determinó por diferencia entre el peso de la muestra fresca y el de la muestra desecada una vez alcanzado el peso constante.

### **II.3.3.2.- Determinación de la actividad de agua ( $a_w$ )**

Se llevó a cabo en un aparato "Decagon" CX-1 a una temperatura de 25 °C. Las medidas se realizaron introduciendo cápsulas de plástico que contenían unos 2 g de muestra fresca en la cubeta del higrometro. Al cabo de 1-2 min, éste proporcionaba la lectura de la temperatura y la  $a_w$  de cada muestra. Previamente a su utilización se comprobó su exactitud con soluciones salinas saturadas de  $a_w$  conocida (Labuza y col. 1976).

### **II.3.3.3.- Medida del pH**

Se realizó a temperatura ambiente en un pHmetro equipado con un electrodo de vidrio que se introdujo en la masa del salchichón y se mantuvo en contacto directo con la carne. Dado el carácter heterogéneo de los embutidos se hicieron 3 medidas por muestra y se obtuvo el promedio. El aparato se calibró previamente mediante dos tampones de comparación (pH 7 y pH 4) y el electrodo se limpió cuidadosamente con etanol después de cada medición (Hoffman, 1988).

### **II.3.3.4.- Extracción y determinación del contenido de grasa**

La fracción lipídica de las muestras fue extraída según el método de Hanson y Olley (1963), que utiliza para ello una mezcla de cloroformo-metanol-agua (2/2/1) (v/v/v), quedando la grasa recogida en la fase clorofórmica. La utilización de este método es muy recomendable si se quiere recuperar de las muestras la totalidad de los lípidos (incluidos los de mayor polaridad) y proceder a una caracterización posterior de los mismos.

### Reactivos

- Cloroformo
- Metanol
- Agua destilada
- BHT
- Sulfato sódico anhidro

### Procedimiento

Se partió de una alícuota de aproximadamente 20 g de salchichón, cuyo contenido de agua, de acuerdo con el método de Hanson y Olley (1963), se ajustó previamente a 16 g y a la que se añadió una punta de espátula del antioxidante BHT. A continuación se mezcló con 20 ml de cloroformo y 40 ml de metanol y se homogeneizó en un "Polytron" acoplado a un baño de hielo durante unos 3 min., al cabo de los cuales se añadieron otros 20 ml de cloroformo y 20 ml de agua destilada para volver a homogeneizar durante 2 min. adicionales. Concluido este proceso, se comenzaba a observar en el homogeneizado final la separación de tres fases: una capa superior de naturaleza acuosa, una intermedia de residuo cárnico y una fase inferior rica en cloroformo. Para conseguir una mejor separación de las mismas se realizó una centrifugación a 1.000 g durante 20 min. a temperatura ambiente.

Una vez separadas netamente las fases, se descartó la superior y, atravesando la del residuo cárnico se recogieron con una pipeta 20 ml de la fase clorofórmica (compuesta en teoría por 40 ml), es decir, un 50% de la grasa de la muestra. Para eliminar impurezas y restos de agua, el volumen recogido fue filtrado a través de sulfato sódico anhidro y trasvasado a viales de vidrio secos y previamente pesados. La evaporación de los disolventes se realizó por burbujeo bajo corriente de nitrógeno y la desecación se completó en un desecador a vacío hasta peso constante.

El porcentaje de grasa de la muestra se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\frac{\% \text{ de grasa} = \frac{P - P'}{M} \times 100 \times 2}{}$$

donde:

P = peso del vial de recogida vacío (gramos)

P' = peso del vial con la grasa desecada (gramos)

M = peso de la muestra fresca (gramos)

El resultado obtenido se multiplica por 2 porque en la técnica sólo se recogen 20 ml de los 40 ml teóricos de la fase clorofórmica.

Los extractos lipídicos así obtenidos se almacenaron en congelación a -18 °C hasta la realización de posteriores análisis, previamente a los cuales se mantuvieron en un desecador de vidrio a vacío durante 3 horas para eliminar la humedad adquirida durante el almacenamiento. Todas las extracciones se hicieron por duplicado.

### **II.3.3.5.- Fraccionamiento de los lípidos por cromatografía en capa fina (TLC)**

#### **1.- Placas utilizadas**

Se emplearon cromatoplasmas de gel de sílice G 60 de 20x20 cm y 10x20 cm con un espesor de capa de 0,25 mm preparadas por "Merck". Previamente a su utilización, estas placas se activaron en estufa a 120 °C durante un tiempo mínimo de 6 horas.

## **2.- Colocación de la muestra**

Se partió de una alícuota de aproximadamente 200 mg de extracto lipídico (obtenido según se indica en II.3.3.5.), que se disolvió en 1 ml de cloroformo. La mezcla se agitó vigorosamente y a continuación se depositaron con una microjeringa 5  $\mu$ l de la disolución así obtenida sobre el lecho cromatográfico, teniendo la precaución de no dañar la superficie del mismo. De esta forma las muestras quedaron colocadas como 2-4 manchas de unos 2 mm de diámetro y situadas a unos 2 cm del borde inferior de la placa (línea de origen).

## **3.- Desarrollo de la cromatografía**

Una vez aplicadas las muestras en la línea de origen del lecho cromatográfico, se introdujeron las placas en una cubeta que contenía la fase móvil constituida por éter de petróleo/éter etílico/ácido acético (80/20/1) (v/v/v), que se dejó correr hasta que el frente llegó a 2 cm del borde superior de la placa.

## **4.- Revelado y lectura de las placas**

Una vez sacadas las placas de la cubeta, se dejaron secar durante 30 minutos y, a continuación, se rociaron con el reactivo para el colesterol y sus ésteres (Lowry, 1968), que está compuesto por  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  al 0,05% en una mezcla de agua destilada/ácido acético/ácido sulfúrico (90/5/5) (v/v/v).

A continuación se llevaron a una estufa donde se mantuvieron a 120 °C durante 20 min, transcurridos los cuales se procedió a su lectura en un densitómetro Shimadzu CS-9000 a una longitud de onda de 390 nm. El colesterol y sus ésteres aparecen como manchas de color rojo-violeta (aquél se

hace visible antes que éstos), mientras que el resto de manchas adquiere una tonalidad marrón parduzca.

Para la identificación de las manchas se utilizaron patrones de colesterol, ácido oleico, monoleína, dioleína y trioleína ("Sigma") y se confeccionaron gráficas patrón para cada uno de estos compuestos (figuras I.2, I.3, I.4 y I.5)

También se emplearon para la identificación de los distintos lípidos apolares reactivos específicos como el de periodato de Schiff (Shaw, 1968) y el reactivo para los ácidos grasos libres de Dudzinski (1967).

Todos los análisis se realizaron por duplicado.

### **II.3.3.6.- Análisis de la fracción de ácidos grasos libres**

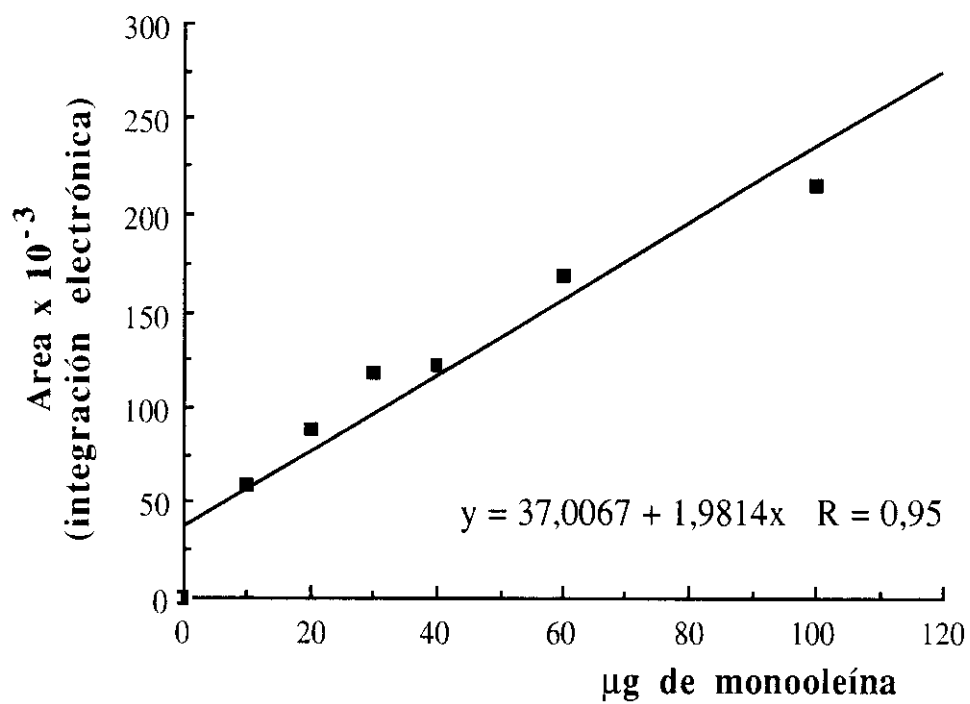
#### **1.- Obtención de la fracción de ácidos grasos libres**

##### **Reactivos**

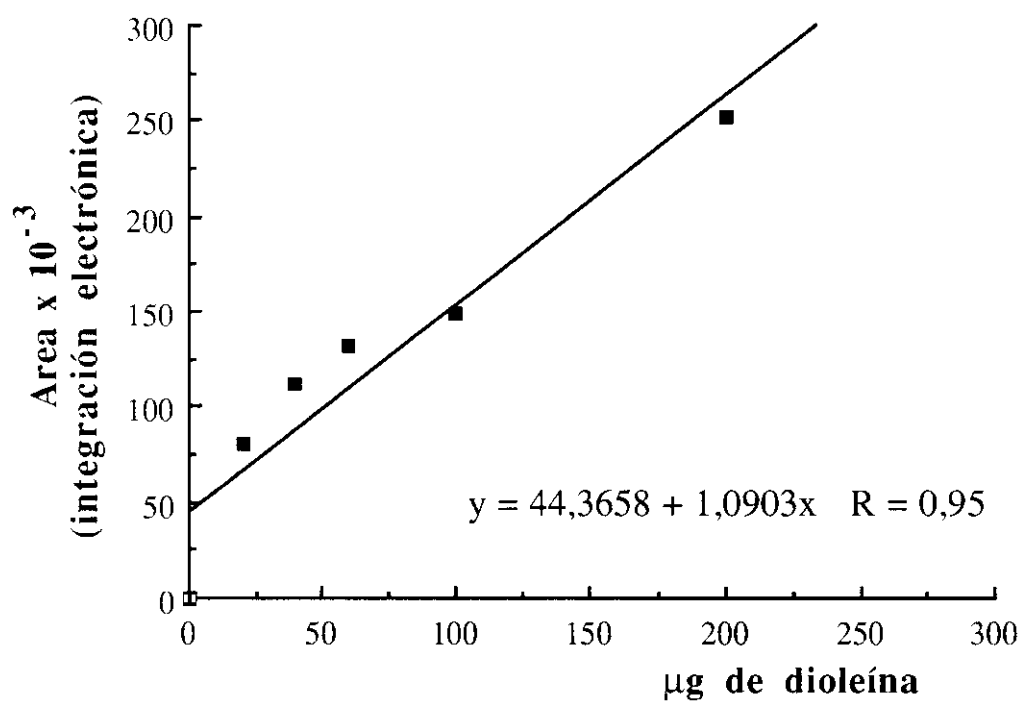
- Eter etílico destilado
- Etanol al 95%
- Agua destilada
- Hidróxido sódico 5N
- Cloruro sódico
- Acido clorhídrico 2N

##### **Procedimiento**

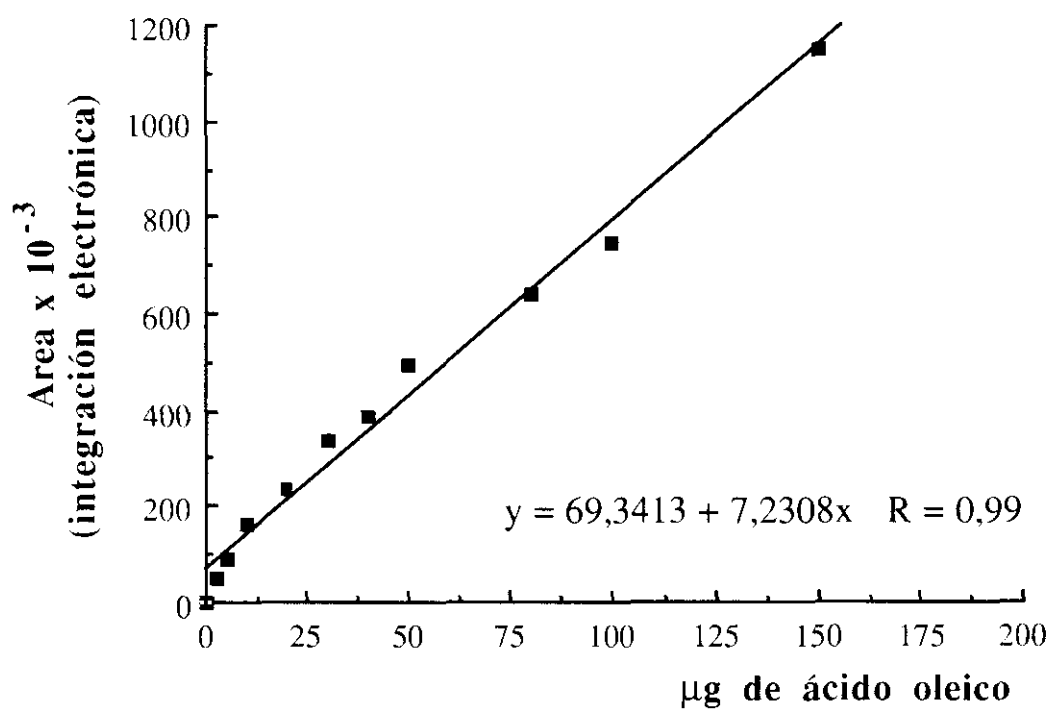
Se disolvió una alícuota de aproximadamente 2 g de grasa (obtenida según se indica en II.3.3.5.) en 5 ml de una mezcla de éter etílico/etanol al 95% (1/1) (v/v) y se agitó bien. Se ajustó a pH 10 con NaOH 5 N mientras se calentaba ligeramente (35 °C) para favorecer la saponificación de los



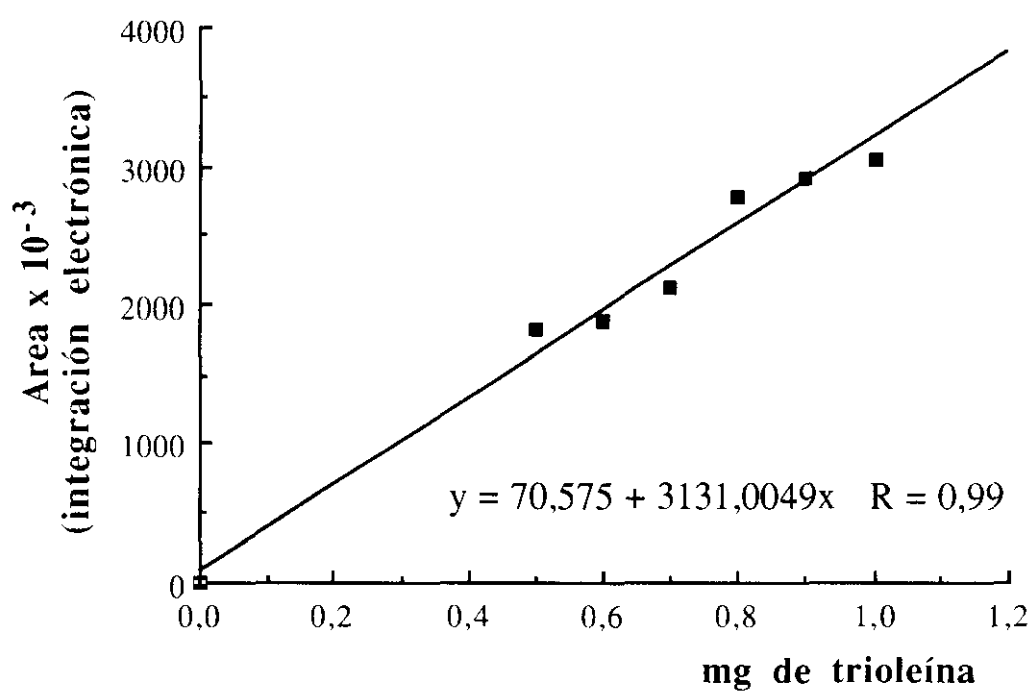
**Figura II.2.-** Recta patrón utilizada para la determinación de monoglicéridos.



**Figura II.3.-** Recta patrón utilizada para la determinación de diglicéridos.



**Figura II.4.-** Recta patrón utilizada para la determinación de ácidos grasos libres.



**Figura II.5.-** Recta patrón utilizada para la determinación de triglicéridos.

ácidos grasos libres y a continuación se hicieron dos extracciones con 40 ml de una mezcla de cloroformo/agua destilada (1/1) (v/v) centrifugando a 1.000 g durante 10 min., transcurridos los cuales se logró la separación de la mezcla en una fase acuosa superior, una intermedia compuesta por el exceso de NaOH y una fase inferior rica en cloroformo. De ambas extracciones se recogieron las fases acuosas (40 ml en total), que eran las que contenían los ácidos grasos libres saponificados.

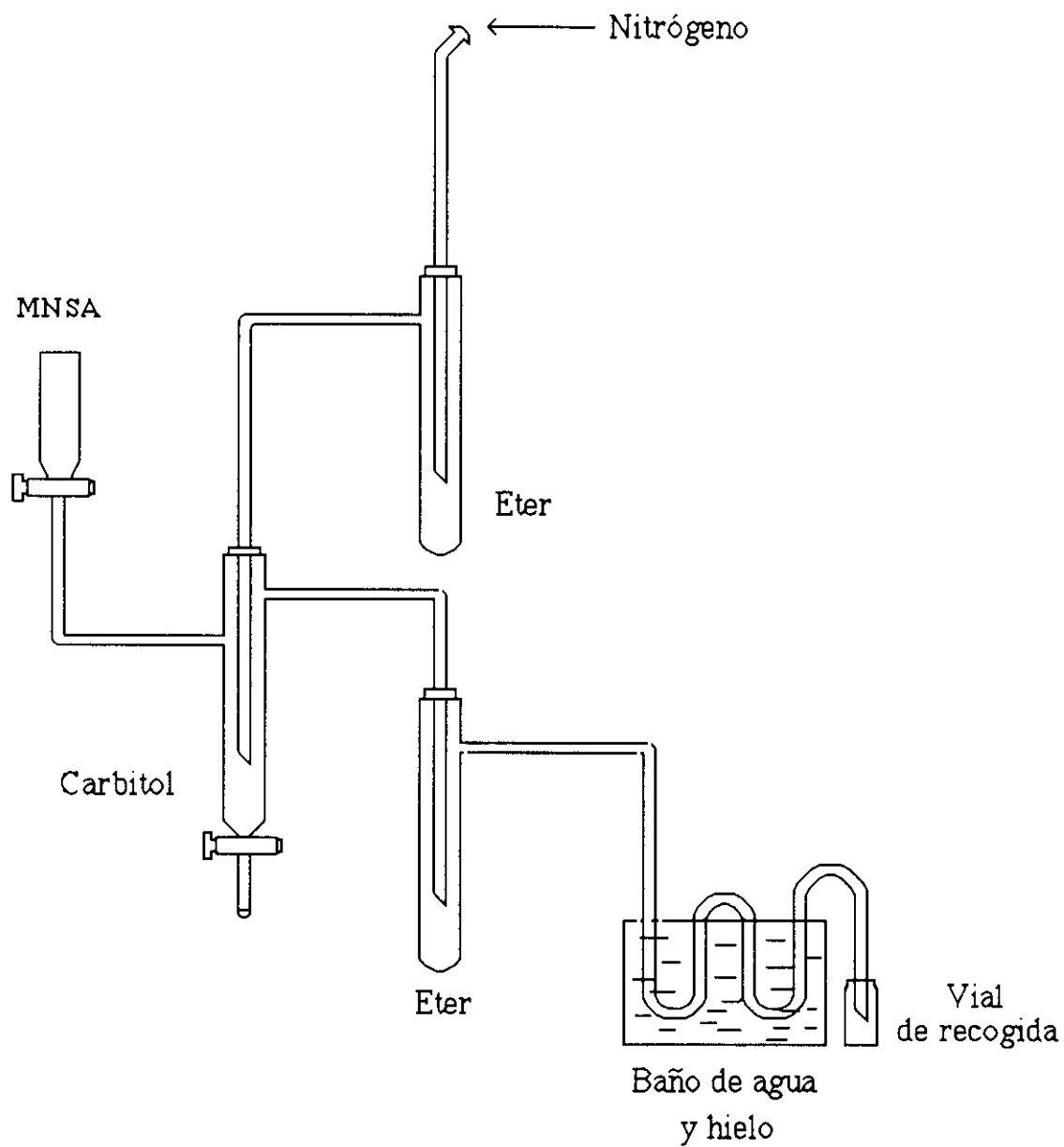
Los 40 ml recogidos al final de las dos centrifugaciones se saturaron con cloruro sódico ("salting-out") y su pH fue ajustado a 2 con ácido clorhídrico 2N para liberar los ácidos grasos. A continuación, se trasvasaron a un embudo de decantación donde se realizaron tres lavados sucesivos con 40 ml de una mezcla de éter etílico/agua destilada (1/1) (v/v), recogiendo siempre la fase de éter etílico. El extracto de ácidos grasos libres así obtenido fue concentrado en el rotavapor para eliminar la mayor parte del disolvente y luego se evaporó a sequedad bajo corriente de nitrógeno en viales de vidrio, en los que se almacenó a -18 °C hasta proceder a su metilación. Todas las extracciones se hicieron por duplicado.

## **2.- Formación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos libres**

Los ácidos grasos libres fueron metilados con diazometano según el procedimiento descrito por Schlenk y Gellerman (1960).

### Reactivos

- Eter etílico destilado
- Eter etílico/metanol (9/1) (v/v)
- Reactivo de M.N.S.A., que se preparó disolviendo alrededor de 2 milimoles de n-metil-n-nitroso-paratoluensulfonamida por



**Figura II.6.-** Dispositivo utilizado para la metilación de los ácidos grasos libres siguiendo el procedimiento de Schlenk y Gellerman (1960).

(metilcianopropilo y metilfenilsilicona 50:50) con 0,15  $\mu\text{m}$  de espesor de capa. Dicha columna se instaló en un cromatógrafo "Perkin-Elmer" mod. 8420 provisto de inyector "split/splitless" de vaporización con temperatura programable (PTV), programador de temperatura del horno, detector de ionización de llama (FID) e integrador, y conectado a una impresora "Perkin-Elmer" mod GP-100.

Las condiciones de trabajo para la realización de los análisis fueron las siguientes:

- Flujo del gas portador (helio): 0,5 ml/min.
- Temperatura del bloque de inyección: 280 °C.
- Temperatura del horno:
  - inicial: 180 °C durante 2 min.
  - gradiente: 4°C/min.
  - final: 220 °C durante 15 min.
- Condiciones del FID:
  - Presión de los gases:
    - hidrógeno: 80 KPa (12 PSIG)
    - aire: 140 KPa (20 PSIG)
  - Temperatura: 280 °C.
- Relación de split: 10:1
- Volumen de inyección: 1  $\mu\text{l}$
- Duración del análisis: 27 min

#### **4.- Identificación de los ácidos grasos**

Se llevó a cabo considerando los tiempos de retención de los picos cromatográficos obtenidos, que fueron comparados con los tiempos de retención de ésteres metílicos patrón de los ácidos palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico ("Sigma") analizados en las mismas

condiciones.

## **5.- Cuantificación de los ácidos grasos identificados**

Se realizó teniendo en cuenta que el contenido de cada uno de los ácidos grasos en la muestra es proporcional al área de pico cromatográfico correspondiente, considerando además la respuesta del detector, para lo cual se aplicó a cada ácido graso su correspondiente factor de corrección. Dichos factores se calcularon mediante 10 análisis de ésteres metílicos patrón en las mismas condiciones que las muestras. Los resultados así obtenidos proporcionaron el porcentaje de cada ácido graso con respecto al total. Para calcular la cantidad real de cada uno se extrapolaron los porcentajes al contenido total de ácidos grasos libres hallado mediante cromatografía en capa fina (TLC).

### **II.3.3.7.- Análisis de la fracción de ácidos grasos volátiles**

#### **1.- Extracción de la fracción de ácidos grasos de cadena corta**

##### **Reactivos**

- Agua destilada
- Solución acuosa de ácido hexanoico al 0,6% (p/v)
- Sulfato de zinc al 25%
- Hidróxido sódico 5N

##### **Procedimiento**

En todas las experiencias se partió de unos 15 g de salchichón que se homogeneizaron con 45 ml de agua destilada en un "Polytron" acoplado a un baño de hielo durante 2-3 min previa adición de 0,1 ml de una solución acuosa

de ácido hexanoico al 0,6% (p/v) como patrón interno. El homogeneizado así obtenido fue centrifugado a 14.000 g durante 10 min a 5 °C , recogiendo el sobrenadante . El sedimento resultante se resuspendió en un volumen adicional de 20 ml de agua destilada para centrifugar otra vez la mezcla en las mismas condiciones. El líquido sobrenadante de la segunda extracción se mezcló con el de la primera y el volumen se ajustó con agua destilada a 60 ml, de los que se tomó una alícuota de 48 ml para el análisis de los ácidos grasos volátiles.

Para precipitar las proteínas presentes en los extractos acuosos, se añadieron a éstos 2-4 ml de una solución de sulfato de zinc al 25%. A continuación se procedió a la saponificación de los ácidos grasos por adición de hidróxido sódico 5N, ajustando a pH 10 y calentando los extractos en un baño de agua a ebullición durante 20 min. Transcurrido este tiempo, las proteínas desnaturalizadas se eliminaron por filtración a través de papel "Whatman" nº 54 y el líquido resultante se concentró a sequedad por liofilización. El residuo seco así obtenido (sales sódicas de los ácidos grasos volátiles) se resuspendió en 5 ml de agua destilada y se mantuvo en congelación a -18 °C hasta el momento de su análisis por cromatografía de gases. Todas las extracciones se hicieron por duplicado.

## **2.- Liberación de los ácidos grasos volátiles**

### **Reactivos**

- Cloruro sódico
- Acido clorhídrico 5N
- Eter etílico destilado
- Sulfato sódico anhidro

### Procedimiento

Se partió de 2 ml de los extractos obtenidos por el método descrito anteriormente, que se recogieron en un tubo de vidrio de 5 ml de capacidad y se saturaron con cloruro sódico para facilitar la liberación de los ácidos grasos. A continuación se ajustó el pH a 2 con ácido clorhídrico 5N para hidrolizar las sales sódicas de los mismos y se añadió 1 ml de éter etílico destilado para extraerlos. Se agitó bien la mezcla y se centrifugó a 1.000 g durante 5 min a 2 °C, tras lo cual se observó en la parte superior del tubo la separación de la fase etérea que contenía los ácidos grasos volátiles. Seguidamente se recogió esta fase y se le añadió una punta de espátula de sulfato sódico anhidro con el fin de eliminar los restos de agua que hubieran podido quedar, procediendo a inyectar rápidamente en el cromatógrafo de gases.

### **3.- Cromatografía gaseosa de los ácidos grasos volátiles**

Se utilizó una columna suministrada por "Phase Sep" de sílice fundida de 30 m de longitud y 0,53 mm de diámetro interno que llevaba como fase estacionaria DB-FFAP (polietilenglicol acidificado) con 1 µm de espesor de capa.

Los análisis se llevaron a cabo en un cromatógrafo "Perkin-Elmer" mod. 8420 provisto de inyector "split/splitless" de vaporización con temperatura programable (PTV), programador de temperatura del horno, detector de ionización de llama (FID) y conectado a una impresora "Perkin-Elmer" mod. GP-100

Las condiciones de trabajo para la realización de los análisis fueron las siguientes:

- Flujo del gas portador (helio): 3,5 ml/min.
- Temperatura del bloque de inyección: 250 °C
- Temperatura del horno: 120 °C (isotermo)
- Condiciones del FID:
  - Presión de los gases:
    - hidrógeno: 110 KPa (16 PSIG)
    - aire: 120 KPa (20 PSIG)
  - Temperatura: 250 °C
- Volumen de inyección: 1 µl
- Duración del análisis: 30 min.

#### **4.- Identificación de los ácidos grasos**

Se llevó a cabo en función de los tiempos de retención de los picos cromatográficos obtenidos mediante el análisis de las muestras, por comparación con los tiempos de retención de ácidos grasos patrón (BDH): acético, propiónico, iso-butírico, n-butírico, metilbutírico, iso-valérico, n-valérico y hexanoico (patrón interno), analizados en las mismas condiciones que las muestras.

#### **5.- Cuantificación de los ácidos grasos identificados**

Para ello se tuvo en cuenta el principio que establece que el contenido de cada ácido graso presente en la muestra es proporcional al área del pico cromatográfico correspondiente, y se calculó a partir de dichas áreas la concentración exacta de cada uno de ellos por el método del patrón interno (ácido hexanoico). Se aplicaron los correspondientes factores de corrección para cada ácido graso, que fueron calculados a partir de 10 análisis de una solución de patrones analizadas en las mismas condiciones que las muestras.

El contenido en microgramos por gramo de muestra fresca de cada

ácido graso de cadena corta identificado se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$\text{Acido graso } (\mu\text{g/g}) = \frac{F_x \cdot A_x \cdot c}{A_c \cdot M}$$

donde:

$F_x$  = factor de corrección para cada ácido

$A_x$  = área del pico del ácido correspondiente

$c$  = concentración de ácido hexanoico (microgramos)

$A_c$  = área del pico de ácido hexanoico

$M$  = peso de la muestra fresca (gramos)

### **II.3.3.8.- Análisis de los aldehídos volátiles**

Se realizó mediante extracción de los compuestos monocarbonilos totales por destilación de las muestras a 40 °C bajo corriente de nitrógeno, recogiendo dichos compuestos en forma de sus 2,4 dinitrofenilhidrazonas en frascos colectores apropiados. Dichas hidrazonas fueron posteriormente analizadas por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en fase reversa.

#### **1.- Extracción y cuantificación de los compuestos monocarbonilos totales**

Se siguió el método descrito por Huertas (1990) basado en los trabajos de Phippen y col. (1958), Ho (1980), Min y col. (1979) y MacDonald y col. (1980).

## Reactivos

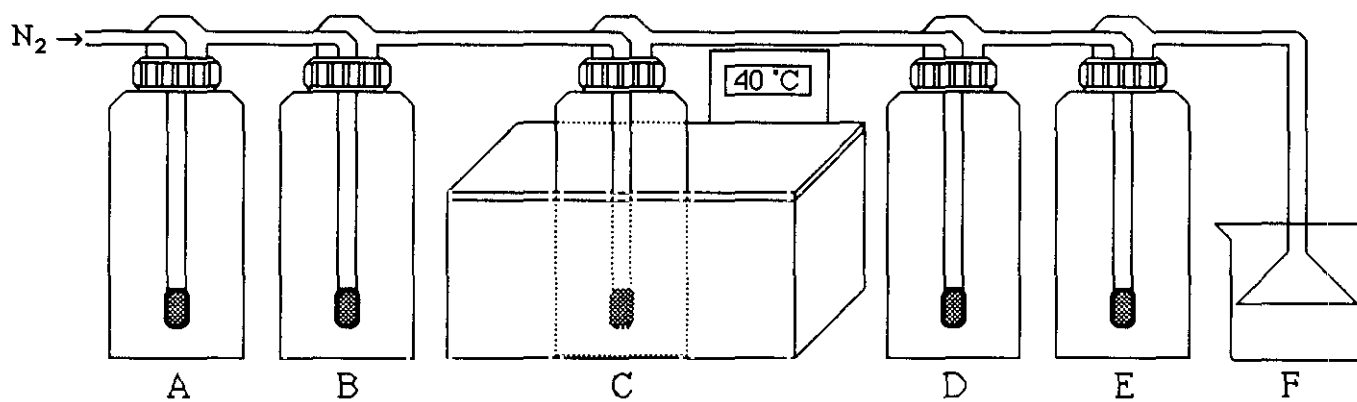
- Reactivo A: solución saturada de 2,4 dinitrofenilhidracina en ácido sulfúrico 2 N
- Reactivo B: solución de pirogalol al 15% en hidróxido sódico al 50%
- Reactivo C: solución de 75 mg de nitrito sódico en 50 ml de cloruro sódico al 20% en agua destilada (p/v)
- Reactivo D: solución de 2 g de 2,4 dinitrofenilhidracina en 1 litro de ácido clorhídrico 2 N
- Hexano libre de compuestos carbonilos (obtenido según se describe en el apartado II.2.2)
- Agua destilada
- Sulfato sódico anhidro

## Procedimiento

El dispositivo de destilación utilizado se componía de 5 frascos lavadores de gases de 250 ml con placa porosa nº 1 (uno de ellos sumergido en un baño de agua) y un vaso de precipitados, todo ello conectado a una fuente de nitrógeno. El esquema aparece en la figura II.7.

Se partió de 25 g de salchichón, que fueron homogeneizados con 50 ml del reactivo C durante 2-3 min en un "Polytron" acoplado a un baño de hielo. La mezcla resultante se recogió en un frasco lavador de gases (frasco C del dispositivo de destilación).

El nitrógeno utilizado para arrastrar los carbonilos volátiles presentes en el frasco C se purificó haciéndolo circular por los frascos lavadores A y B, que contenían 100 ml de los reactivos A (frasco A) y B (frasco B). Los carbonilos, una vez arrastrados por el nitrógeno eran recogidos en tres recipientes colectores que contenían 100 ml del reactivo D cada uno (D,E y F).



**Figura II.7.-** Dispositivo utilizado para la destilación y obtención de los compuestos monosacáridos totales.

La destilación se llevó a cabo a 40 °C y su duración fue de 20 horas, al cabo de las cuales los compuestos monocarbonilos retenidos en los frascos D,E y F del dispositivo como sus 2,4 dinitrofenilhidrazonas se trasvasaron a un embudo de decantación para su extracción. Para ello se realizaron cinco lavados sucesivos con 130 ml de hexano libre de carbonilos y los 650 ml resultantes se lavaron tres veces con 250 ml de agua destilada, se desecaron sobre sulfato sódico anhidro y se filtraron a través de papel "Whatman" nº 4.

A continuación se midió en el espectrofotómetro la absorbancia a 340 nm de la solución obtenida y se calculó la concentración total de 2,4 dinitrofenilhidrazonas a partir de la ecuación de Lambert-Beer utilizando un coeficiente de extinción molar de  $22.500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Asimismo se preparó un blanco agitando 6 ml de reactivo D con 12 ml de hexano destilado. Según los estudios de Lawrence (1965) sobre la utilización de 2,4 dinitrofenilhidracina para la evaluación de pequeñas cantidades de carbonilos, se obtienen porcentajes de recuperación de 97-100%.

Por último se procedió a eliminar el disolvente en el rotavapor a 30 °C, seguido de burbujeo por corriente de nitrógeno, tras lo cual las hidrazonas fueron almacenadas en congelación a -18 °C en viales de vidrio hasta el momento de su análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Todas las experiencias se realizaron por duplicado.

## **2.- Análisis cromatográfico de los compuestos monocarbonilos**

Se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en fase reversa de las 2,4 dinitrofenilhidrazonas (obtenidas como se ha descrito en el apartado anterior) siguiendo el método de Stan y Reindl (1982).

Se utilizó una columna de fase reversa "Waters" "Nova Pak" C18 (ODS

ligado a sílice amorfa, 4  $\mu\text{m}$ ) de 15 cm de longitud y 3,9 mm de diámetro interno. El equipo de HPLC empleado consistió en una multibomba Waters" mod. 600, un inyector "Waters" mod. U6K, un horno "Kontron" mod. 990 y un detector fotodiodo "Waters" mod. 990, conectado a un ordenador "NEC" mod. APC III y a una impresora "Waters" mod. 990.

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

- Fase móvil: acetonitrilo/agua/tetrahidrofurano (75/24/1) (v/v/v/)
- Flujo de la fase móvil): 0,8 ml/min, isocrático
- Temperatura de la columna: 40 °C
- Detector a 360 nm
- Volumen de inyección: 10  $\mu\text{l}$
- Duración del análisis: 15 min.

Previamente a su inyección los extractos de 2,4 dinitrofenilhidrazonas se diluyeron en 1 ml de fase móvil.

### 3.- Identificación de los aldehídos

Se efectuó por comparación de los tiempos de retención de los picos cromatográficos obtenidos en las muestras con los de 2,4 dinitrofenilhidrazonas de aldehídos patrón ("Aldrich", "Fluka", "Sigma", "Scharlau" y "Jansen"): pentanal, hexanal, heptenal, nonanal, decanal, *trans*-2-hexenal, *trans*-2-heptenal, *trans*-2-octenal, *trans*-2-nonenal, *trans*-2-decenal, *trans,trans*-2,4-heptadienal, *trans,trans*-2,4-nonadienal y *trans,trans*-2,4-decadienal, todos ellos analizados en las mismas condiciones que las muestras.

#### **4.- Cuantificación de los aldehídos**

Se realizó mediante el método directo, relacionando el contenido de cada aldehído en las muestras con el área registrada para el pico cromatográfico correspondiente y utilizando los respectivos factores de corrección (que se calcularon a partir de 10 análisis de una solución de patrones en iguales condiciones que las muestras).

#### **II.3.3.9.- Análisis sensorial**

Se realizaron 2 pruebas: triangular y preferencial.

##### **1.- Jurado de catadores**

Entre los miembros del Departamento se seleccionó un jurado compuesto por 20 catadores, a los que previamente se explicó de forma detallada el objetivo del presente trabajo y las características de las pruebas que iban a realizar.

##### **2.- Preparación de las muestras**

Al final de la maduración de los lotes de embutidos se tomó un número suficiente de los mismos, que se cortaron en lonchas de alrededor de 1 cm de grosor inmediatamente antes de la realización de las pruebas.

##### **3.- Prueba triangular**

Entre las diversas pruebas de diferenciación existentes se escogió la prueba triangular, que se realizó de acuerdo con la norma TC 34/SC 12 de la I.S.O. (International Standards Organisation). Se trata de que el catador identifique en un trío de muestras codificadas, de las que dos son iguales y una

diferente, cuál es la diferente. La probabilidad de elegir la muestra distinta al azar es  $1/3$  y las combinaciones posibles de colocación de las muestras son 6:

ABB    BAA  
AAB    BBA  
ABA    BAB

Cada lote de embutidos se analizó por separado y en cada uno se compararon los salchichones que contenían lipasa con su control. A cada catador se le entregó una combinación de las 6 posibles donde:

A= muestras de salchichón con lipasa pancreática

B= muestras de salchichón control

Una vez concluida la prueba se interpretaron los resultados de acuerdo con las tablas especificadas por la norma I.S.O. para establecer el nivel de significación y la probabilidad.

#### **4.- Prueba preferencial**

En este caso se trata de que el jurado evalúe, de acuerdo con una escala establecida ciertas características organolépticas de la muestra. Así pues, a cada catador se le pidió que puntuara por separado el color y la apariencia, la textura y el sabor y aroma de cada muestra de acuerdo con una escala hedónica de 1 (muy malo) a 10 (muy bueno).

Finalizada la prueba, se calculó la media de las puntuaciones obtenidas para cada característica. La calidad global de las muestras también se expresó sobre 10, multiplicando por un factor 0,1 el color y apariencia, por 0,25 la textura y por 0,65 el sabor y aroma.

---

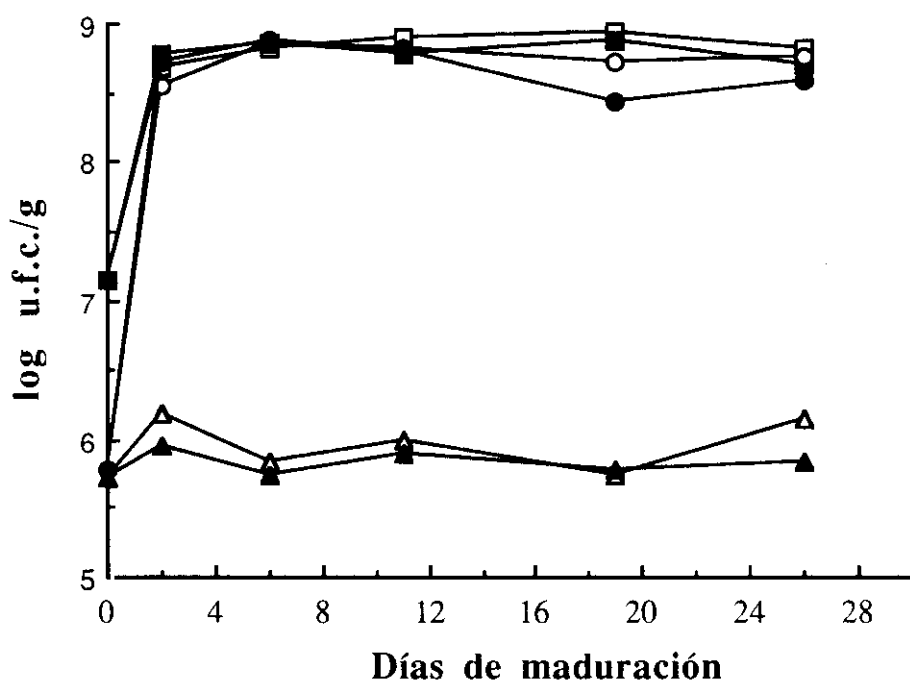
*CAPITULO III*  
*RESULTADOS Y DISCUSION*

---

### **III.1.- EVOLUCION DE LA FLORA MICROBIANA**

Con el fin de observar si la adición de lipasa pancreática ocasionaba, por ella misma o por la acumulación de los ácidos grasos que libera, alguna variación en la evolución normal de la flora microbiana que participa en la maduración de los embutidos experimentales (salchichones), se determinó el número total de viables, la flora láctica y las micrococáceas, de acuerdo con la metodología descrita en el apartado II.3.2. Los resultados obtenidos se recogen (expresados en log. u.f.c./g) en la figura III.1, en la que se muestra la evolución de la flora de un lote de embutidos control y el correspondiente adicionado de lipasa, madurados ambos a lo largo de 4 semanas. En dicha figura quedan englobados también los resultados de los embutidos madurados durante 14 días.

La evolución observada fue similar en todos los lotes experimentales y se correspondió con los resultados hallados en otros embutidos por distintos autores (Palumbo y Smith, 1977; Sanz y col., 1988; Selgas y col., 1988; Domínguez y col., 1989; Vignolo y col., 1989; Samelis y col., 1993). Lo más significativo fue la tasa inicial de bacterias totales de los diferentes lotes, propia de embutidos elaborados sin la adición de cultivos iniciadores. No obstante, dicha tasa siempre estuvo comprendida entre  $10^6$  y  $10^7$  u.f.c./g, estabilizándose en valores nunca inferiores a  $10^8$  u.f.c./g. En el ejemplo de la figura III.1, la flora total partió de niveles de  $10^7$  u.f.c./g, aumentando explosivamente durante los primeros días de maduración (correspondientes a la fase fermentativa) y se estabilizó hasta el final del proceso en valores próximos a  $10^9$  u.f.c./g. Se pueden hacer consideraciones similares respecto a la flora láctica, que siguió una evolución muy parecida, aumentando también de forma acusada durante las primeras 48 horas del proceso madurativo. En este caso las cifras originales fueron unas 10 veces menores que las de la flora total, pero alcanzaron niveles finales iguales a éstas. En la figura se comprueba que las gráficas correspondientes a los recuentos en PCA (flora total) y MRS



**Figura III.1.-** Evolución de la flora microbiana de un embutido control (□ ○ △ ) y de uno elaborado con 180 unidades de lipasa pancreática (■ ● ▲) a lo largo del periodo madurativo: Flora total (□ ■ ); Bacterias lácticas ( ○ ● ); Micrococáceas ( △ ▲ ).

(flora láctica) llegan a superponerse, por lo que, según los resultados propios y los obtenidos por otros autores (Parejo y col., 1979; Lücke, 1986; Sanz y col., 1988), los microorganismos principalmente responsables del recuento total en los embutidos crudos curados son las bacterias lácticas y dentro de este grupo, siempre de acuerdo con los autores antes mencionados, los lactobacilos homofermentativos mesófilos.

Por último, las micrococáceas, principales microorganismos lipolíticos de los embutidos, partieron de tasas iguales o ligeramente superiores a las bacterias lácticas y aumentaron de forma muy moderada durante los primeros días o se estabilizaron desde el principio en niveles en torno a  $10^6$ - $10^7$  u.f.c./g. Estas observaciones coinciden con las de diversos autores (Burgos, 1981; Lücke, 1986; Selgas y col., 1988), que señalan que el desarrollo de estos microorganismos es precoz, pero se ve pronto frenado por las condiciones de acidez y baja tensión de oxígeno que se crean en el embutido. En todos los embutidos elaborados con lipasa pancreática, el comportamiento de las micrococáceas fue similar al mostrado en la figura III.1, no observándose diferencias apreciables entre los embutidos controles y los elaborados con enzima.

### **III.2.- EVOLUCION DEL CONTENIDO DE HUMEDAD**

Los cambios en el contenido de humedad de los distintos lotes aparecen reflejados en las figuras III.2, para los salchichones madurados durante 14 días y III.3 para los madurados durante 28 días. En cada figura se representa como control el conjunto de los distintos valores medios calculados a partir de todos los lotes con el mismo periodo de maduración. A lo largo del presente capítulo se hará referencia por separado a los embutidos controles y a los elaborados con lipasa pancreática. En este punto conviene recordar que la nomenclatura de los lotes se basó en la cantidad de lipasa pancreática que se añadió a cada uno de ellos y que las cantidades de enzima correspondientes fueron las siguientes:

Lote 3: 3 unidades; Lote 10: 10 unidades; Lote 30: 30 unidades; Lote 40: 40 unidades; Lote 60: 60 unidades; Lote 90: 90 unidades; Lote 180: 180 unidades; Lote 250: 250 unidades; Lote 500: 500 unidades.

Como es lógico, se observó una reducción del contenido de humedad de los embutidos durante la maduración, lo que obviamente supuso un incremento del extracto seco. El contenido de humedad registrado inmediatamente después de la formulación representó más del 60% del producto fresco y descendió hasta valores del orden del 40-45% en todos los lotes al final del proceso. Comparando las figuras III.2 y III.3 se puede observar que dichas cifras finales fueron sólo muy ligeramente superiores en los salchichones madurados durante menos tiempo, lo que parece indicar que la deshidratación más intensa tuvo lugar durante la segunda y tercera semana de maduración, para luego seguir un ritmo más lento hasta el final del proceso de 4 semanas. Este comportamiento coincide con el observado por otros autores (Incze, 1987; Stiebing y Rödel, 1988). Por otra parte, el contenido acuoso de los lotes 250 y 500 fue también ligeramente superior al resto de los lotes madurados en las mismas condiciones, lo que podría estar en relación con el elevado grado de proteolisis observado en estos embutidos y su consiguiente efecto en el pH y la capacidad de retención de agua de los mismos (Beriain y col., 1993).

Valores finales similares a los registrados en este trabajo han sido descritos en diferentes embutidos, como diversos tipos de salami (Acton y Dick, 1976; Genigeorgis y col., 1986; Vignolo y col., 1989) y chorizos españoles (Mendoza y col., 1983; Astiasarán y col., 1990). Sin embargo, son sensiblemente superiores a los citados por Serrano Moreno (1979) en salchichón español, Lücke (1984) en salchichón francés y Samelis y col. (1993) en embutidos griegos, que han observado en el producto acabado cifras inferiores al 30% de humedad. Recientemente, Beriain y col. (1993) citan cifras del 30-40% en salchichones españoles de distintas marcas comerciales. Como se puede suponer, estas diferencias en el contenido de humedad final

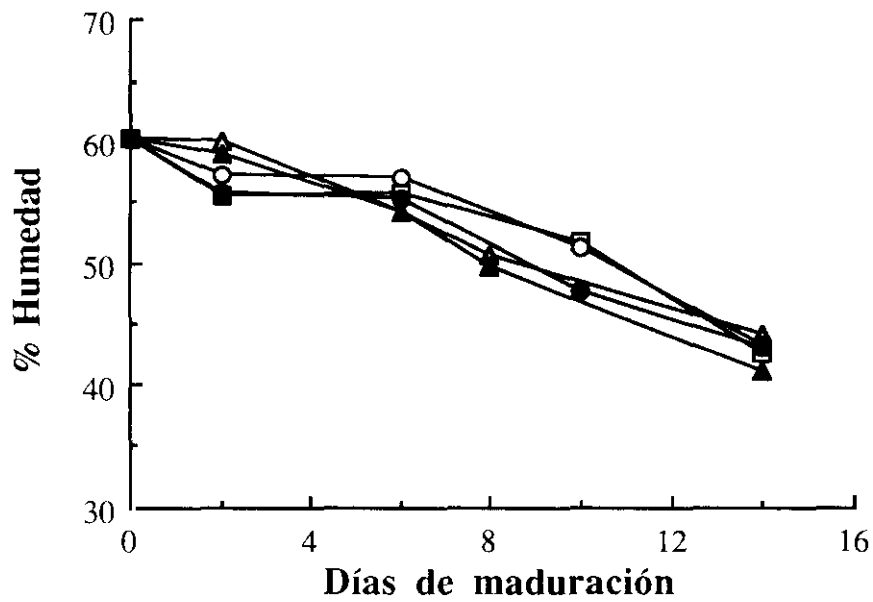


Figura III.2.- Evolución del contenido de humedad (% de peso fresco) de los lotes de embutidos madurados durante 14 días: ( □ ) Control ; ( △ ) Lote 10 ; ( ▲ ) Lote 30 ; ( ○ ) Lote 40 ; ( ● ) Lote 60.

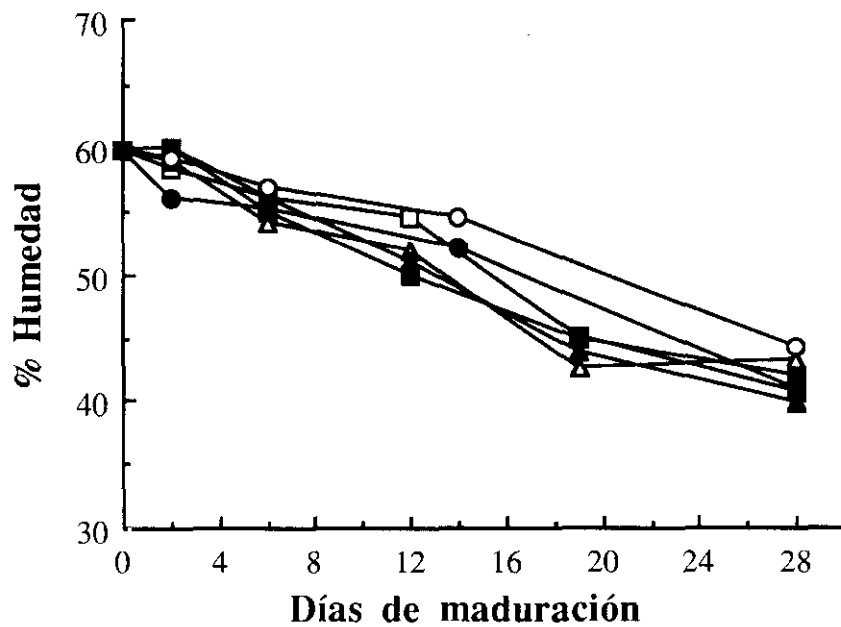


Figura III.3.- Evolución del contenido de humedad (% de peso fresco) de los lotes de salchichones madurados durante 28 días: ( □ ) Control ; ( ■ ) Lote 3 ; ( △ ) Lote 90 ; ( ▲ ) Lote 180 ; ( ○ ) Lote 250 ; ( ● ) Lote 500.

entre los diferentes tipos de embutidos e incluso en un mismo tipo de producto, van a depender en gran medida de la humedad relativa ambiental, aunque también hay que tener en cuenta otros factores que se analizarán a continuación.

Como consecuencia de la pérdida de agua, en los embutidos experimentales se observó una merma de peso de un 15-20% al final del proceso. Estos valores se encuentran dentro del intervalo previsto en este tipo de productos (Lücke, 1985; Nychas y Arkoudelos, 1990) y corresponderían, dentro de la clasificación que hacen estos autores, a la categoría de embutidos semisecos. No obstante, estas cifras pueden considerarse ligeramente inferiores a las recogidas en la bibliografía como habituales para un producto con la denominación comercial de salchichón (Serrano Moreno, 1979; Lücke, 1984; Beriain y col. 1993). Según Keller y col. (1974) las pérdidas de peso superiores al 30% requieren periodos madurativos más largos, generalmente de más de 15 días. Se pueden encontrar diversas explicaciones a los valores de pérdida de humedad observados en los salchichones experimentales. Así, Palumbo y col. (1976) señalan que los bajos niveles de deshidratación (y por lo tanto de pérdida de peso) en los embutidos pueden estar motivados por un picado muy fino de la grasa o por un elevado contenido de la misma, como es el caso de los embutidos que fueron objeto de este trabajo. Por otra parte, según Sharma y Mukhopadhyay (1992), la reducción de peso está directamente relacionada con los valores de pH del producto, siendo más elevada a pH inferiores a los registrados en los salchichones experimentales. Por último, se ha señalado que los productos elaborados solamente con carne de cerdo pierden humedad más fácilmente debido a la menor capacidad de retención de agua de la proteína de cerdo en comparación con las proteínas de otras especies (Bacus, 1984).

### III.3.- EVOLUCION DE LA ACTIVIDAD DE AGUA ( $a_w$ )

Debido al descenso del contenido de agua durante la maduración de los embutidos experimentales se pudo observar una evolución decreciente de la actividad de agua ( $a_w$ ) de los mismos. Las figuras III.4 y III.5 muestran los resultados obtenidos en los salchichones madurados durante 14 y 28 días respectivamente.

La  $a_w$  inicial, próxima a 0,97 en todos los casos, fue disminuyendo de forma progresiva hasta alcanzar valores de 0,90-0,92 en los lotes de 14 días de maduración. En los embutidos con un periodo de maduración más largo se alcanzaron valores de 0,86-0,87, tanto en los controles como en los experimentales fabricados con las distintas cantidades de enzima. De acuerdo con lo observado en el ritmo de deshidratación, en estos embutidos se pudo apreciar una estabilización o ralentización del descenso de la  $a_w$  a partir de la tercera semana (en los lotes 250 y 500, en los que no se tomaron muestras ese día), que está de acuerdo con las observaciones de otros autores (Selgas, 1985; Sanz y col., 1988).

En general, valores de  $a_w$  en torno a 0,90 se pueden considerar característicos de la mayor parte de los embutidos secos (Burgos, 1981). Los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con los registrados recientemente por Beriain y col. (1993) en distintas marcas de salchichón español existentes en el mercado y son similares a los citados para salami de distintas procedencias (Lücke, 1986; Genigeorgis y col., 1986; Stiebing y Rödel, 1988), chorizo (Sanz y col., 1988; Domínguez y col., 1989; Astiasarán y col., 1990) y otros embutidos (Palumbo y col., 1976; León Crespo y col., 1978; Serrano Moreno, 1979; Ziegler y col., 1987).

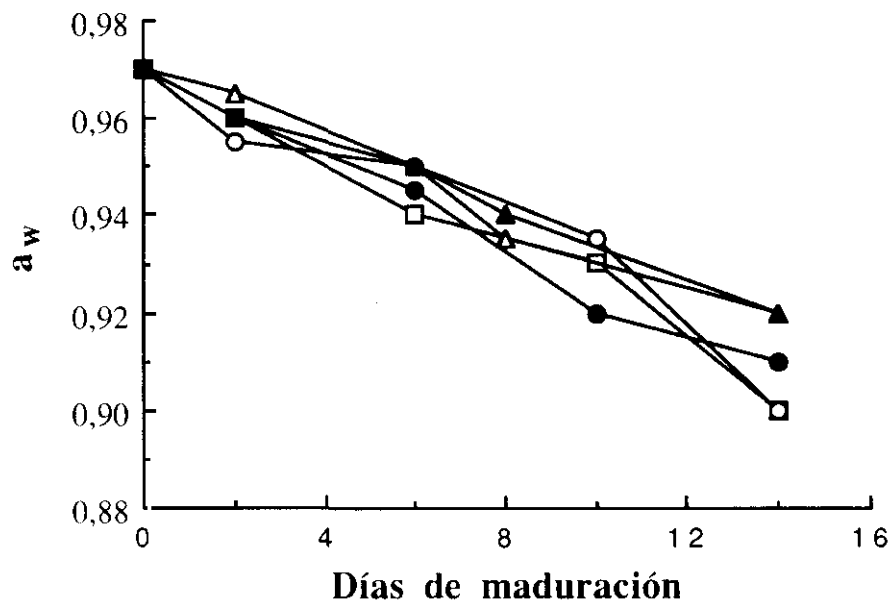


Figura III.4.- Evolución de la actividad de agua ( $a_w$ ) de los lotes de embutidos madurados durante 14 días: ( □ ) Control; ( △ ) Lote 10; ( ▲ ) Lote 30; ( ○ ) Lote 40; ( ● ) Lote 60.

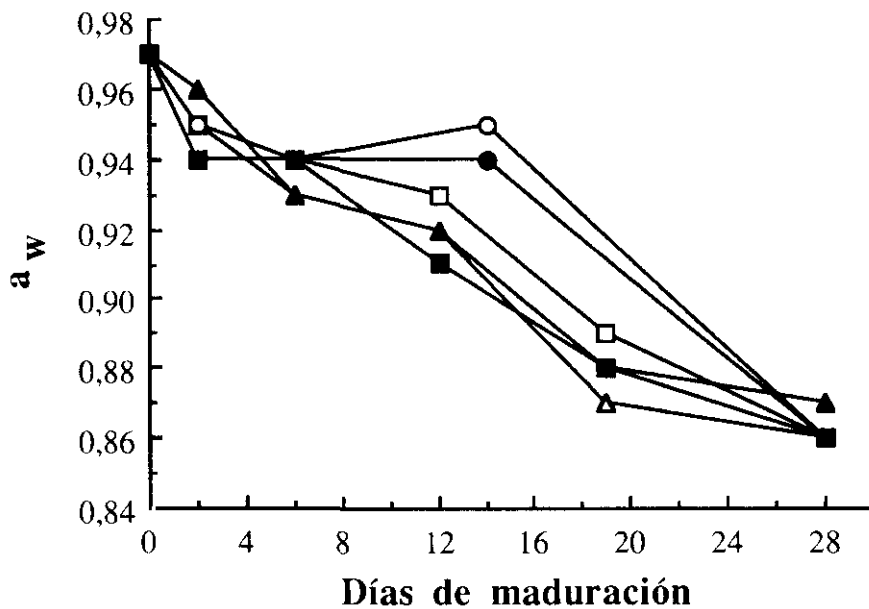


Figura III.5.- Evolución de la actividad de agua ( $a_w$ ) de los lotes de embutidos madurados durante 28 días: ( □ ) Control; ( ■ ) Lote 3; ( △ ) Lote 90; ( ▲ ) Lote 180; ( ○ ) Lote 250; ( ● ) Lote 500.

### III.4.- EVOLUCION DEL PH

La evolución del pH a lo largo de la maduración de los embutidos experimentales se puede observar en la figura III.6 (correspondiente a los lotes madurados durante 14 días) y III.7 (correspondiente a los madurados durante 28 días). El pH de la masa preparada para embutir fue similar en todos los embutidos (en torno a 5,9) y descendió de forma muy marcada durante la primera semana del proceso. A partir de entonces se apreció una estabilización e incluso un ligero aumento hasta el final del periodo madurativo. Los valores medios finales de los embutidos control fueron de 5,1, tanto en los lotes madurados durante 14 como durante 28 días. Estos valores se registraron también en los lotes 10, 30, 40 y 60, madurados durante 14 días. Sin embargo, en los salchichones madurados durante 28 días, el pH final osciló desde 4,9 en el lote 3 hasta 5,3 en el lote 500. Los valores intermedios fueron de alrededor de 5,1, similares a los controles.

Los resultados obtenidos en este trabajo se encuentran dentro del amplio intervalo de valores citado para este tipo de productos, que oscilan desde 4,5 registrado en salami americano por Genigeorgis y col. (1986) hasta cifras superiores a 6,0 descritas en salami italiano y húngaro (Graner y col., 1983; Incze, 1987; Nagy y col., 1989) y en el salchichón de Vich (Ferrer y Arboix, 1986). Estas amplias variaciones están relacionadas, sin duda, con las distintas cantidades y tipos de azúcares utilizados, el empleo o no de iniciadores, las condiciones de maduración, etc. (Domínguez, 1988). En concreto, la evolución del pH observada en los embutidos experimentales es similar a la registrada en distintos chorizos españoles (Lois y col., 1987; Sanz y col., 1988; Domínguez y col., 1989; Astiasarán y col., 1990) y diversos tipos de salami (Paleari Bianchi y col., 1985; Stiebing y Rödel, 1988) y salchichón (García y col., 1992; Beriain y col., 1993) y se puede considerar como normal para otros embutidos (Acton y Dick, 1976; Nychas y Arkoudelos, 1990, Samelis y col., 1993). Estas cifras corresponden, dentro de la clasificación de

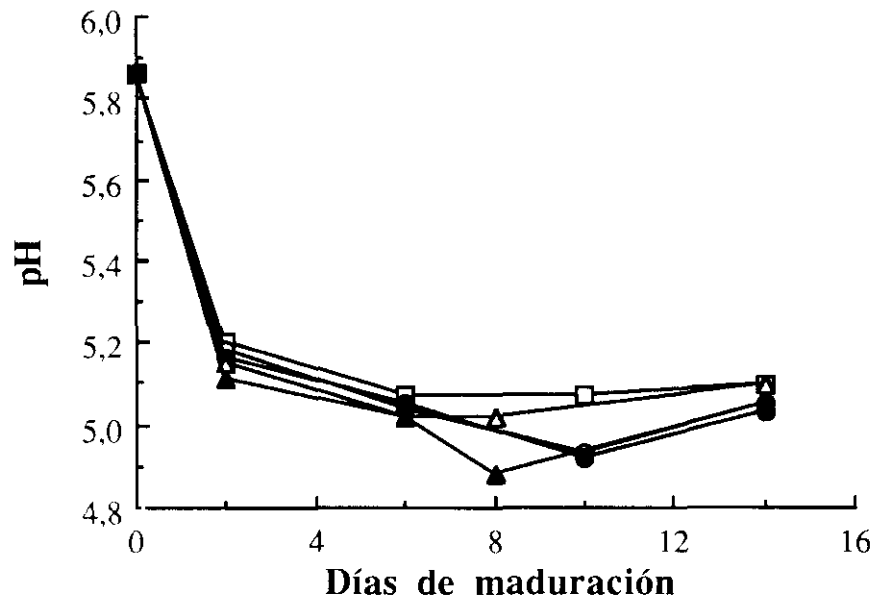


Figura III.6.- Evolución del pH de los lotes de embutidos madurados durante 14 días: (□) Control; (△) Lote 10; (▲) Lote 30; (○) Lote 40; (●) Lote 60.

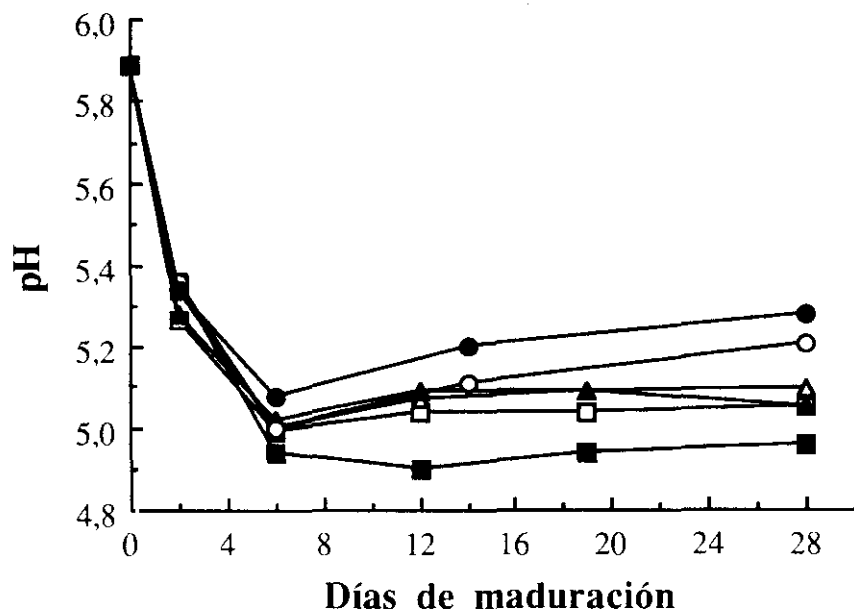


Figura III.7.- Evolución del pH de los lotes de embutidos madurados durante 28 días: (□) Control; (■) Lote 3; (△) Lote 90; (▲) Lote 180; (○) Lote 250; (●) Lote 500.

Incze (1992), a la categoría de embutidos "muy ácidos", caracterizados por un pH final inferior a 5,3.

El aumento de pH observado en los últimos estadios de la maduración, y más concretamente a partir de la segunda semana, coincide con las observaciones de otros autores (Deketelaere y col., 1974 ; Wardlaw y col. 1973 a, b; Lücke, 1988). Este ligero aumento, más claro en las muestras que se maduraron durante 28 días, se debe posiblemente a la acción proteolítica bacteriana y a la consiguiente formación de péptidos, amoníaco y aminoácidos libres (Dierick y col., 1974; Klement y col., 1974; Demeyer y col., 1979; Verplaetse y col., 1989). En los lotes 250 y 500, en los que la cantidad de lipasa añadida fue muy elevada, habría que añadir a la actividad proteolítica mencionada anteriormente, la originada por las impurezas del extracto enzimático utilizado, ya que, según las indicaciones de la firma suministradora, poseía también una ligera actividad proteásica y amilásica que probablemente sólo se refleja cuando se emplea una gran cantidad de dicho extracto (como en el caso de los lotes 250 y 500). Quizás este hecho sea el responsable del mayor contenido de humedad determinado en ambos lotes, en los que al ser mayor el pH, aumenta la capacidad de retención de agua de la carne, dificultando la deshidratación.

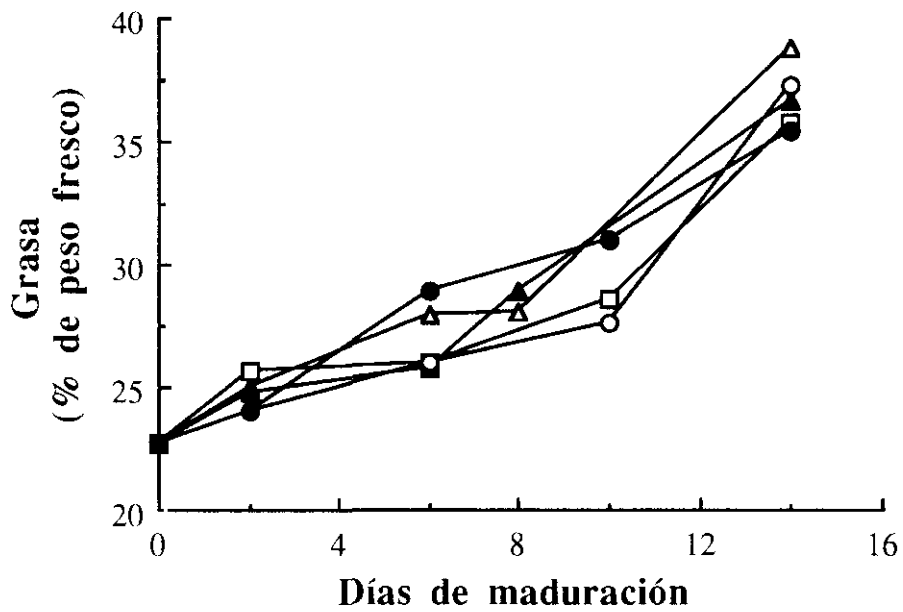
### **III.5.- EVOLUCION DEL CONTENIDO LIPIDICO TOTAL**

La materia grasa de los embutidos se extrajo mediante el método de Hanson y Olley (1963), según se describe en el apartado II.3.3.5. Se empleó dicho método porque la extracción con cloroformo-metanol permite la recuperación de los lípidos más polares, lo que no sucede al emplear un único disolvente orgánico, como es el caso del método de Soxhlet. Los extractos así obtenidos sirvieron para determinar el contenido lipídico de los salchichones experimentales, así como para estudiar su composición. Los resultados se

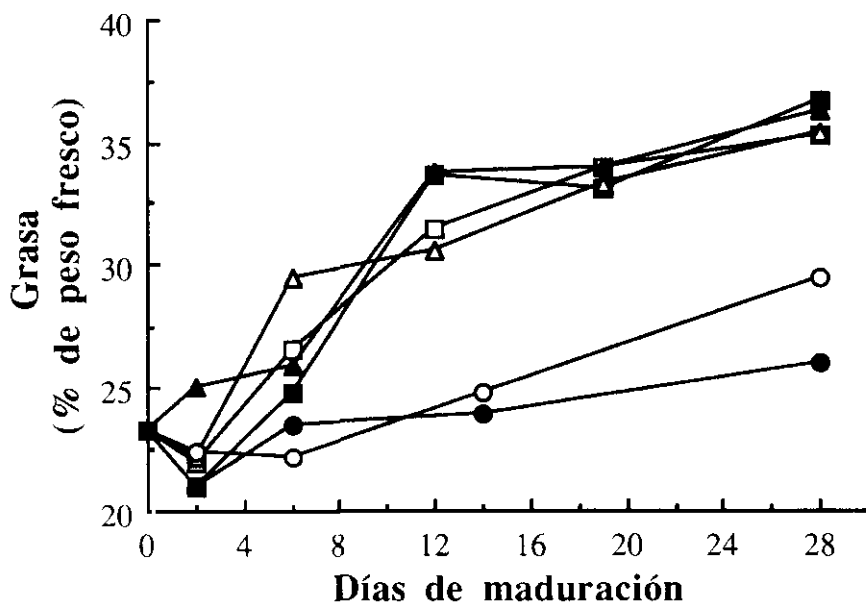
expresaron en términos de porcentaje sobre peso fresco (figuras III.8 y III.9) y sobre extracto seco (figuras III.10 y III.11).

Partiendo de un contenido lipídico total en la masa preparada para embutir de aproximadamente un 23% en todos los lotes, se alcanzaron valores finales comprendidos entre un 35% y un 39% sobre peso fresco, excepto en los lotes 250 y 500. En dichos embutidos se obtuvieron cifras finales del 29% y 26% respectivamente. En cuanto a la evolución del contenido lipídico referido a extracto seco, los valores finales oscilaron en todos los lotes (tanto controles como elaborados con lipasa pancreática) entre un 59% y un 63%, excepto los lotes 250 y 500, cuyos valores, al igual que en términos de peso fresco, fueron menores durante todo el proceso madurativo, registrándose en ellos cifras finales de un 53% y un 48% respectivamente. La variabilidad del contenido de grasa en términos de extracto seco que se observó entre las muestras puede atribuirse, en su mayor parte, a la falta de homogeneidad en su redistribución en el amasado (Melgar y col., 1990). Estos autores señalan, en el caso del salami, niveles de contenido de grasa respecto a extracto seco que varían a lo largo de la maduración entre un 53,4% y un 61%.

Los resultados obtenidos en los lotes 250 y 500 merecen un análisis más detallado. El contenido de grasa que se observó en dichos embutidos fue significativamente menor que el registrado en el resto. Estos lotes presentaron a la vez un contenido de humedad superior, por lo que los resultados de la materia grasa, expresados en términos de peso fresco se podrían atribuir a este hecho, pero, en ese caso, al transformar estos valores en términos de extracto seco deberían corregirse las diferencias (figura III.11). Sin embargo, no ocurrió así, por lo que hay que atribuir este menor porcentaje de materia grasa a otras causas. Para intentar explicar el origen de este descenso del contenido de grasa se han recogido en la tabla III.1 los valores exactos obtenidos en el experimento realizado con el lote 500. En dicha tabla se puede observar (de forma más clara en los resultados expresados en términos de extracto seco) que



**Figura III.8.-** Evolución del contenido lipídico total (% de peso fresco) de los lotes de embutidos madurados durante 14 días: ( □ ) Control; ( △ ) Lote 10; ( ▲ ) Lote 30; ( ○ ) Lote 40; ( ● ) Lote 60.



**Figura III.9.-** Evolución del contenido lipídico total (% de peso fresco) de los lotes de embutidos madurados durante 28 días: ( □ ) Control; ( ■ ) Lote 3; ( △ ) Lote 90; ( ▲ ) Lote 180; ( ○ ) Lote 250; ( ● ) Lote 500.

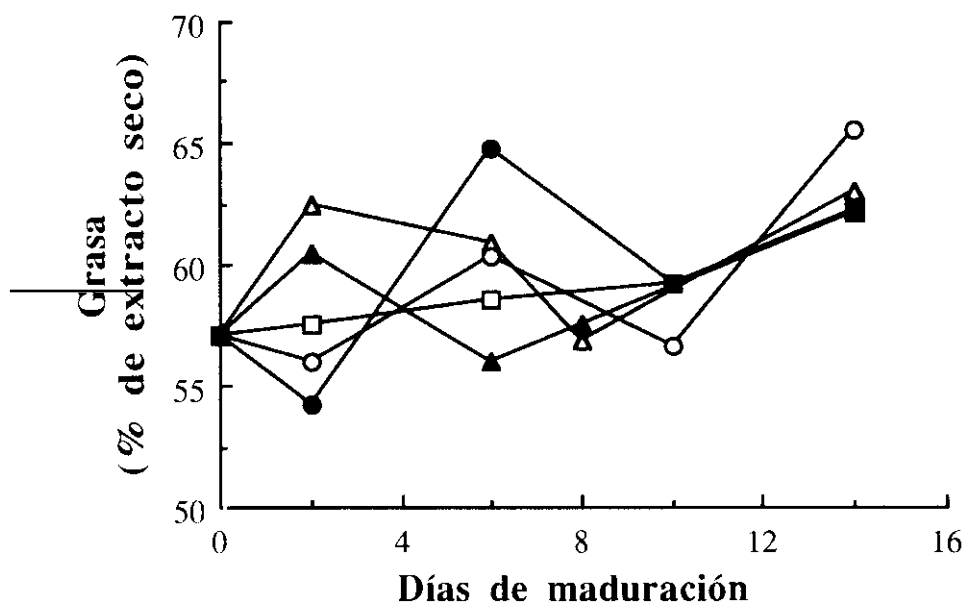


Figura III.10.- Evolución del contenido lipídico total (% de extracto seco) de los lotes de embutidos madurados durante 14 días: ( □ ) Control; ( △ ) Lote 10; ( ▲ ) Lote 30; ( ○ ) Lote 40; ( ● ) Lote 60.

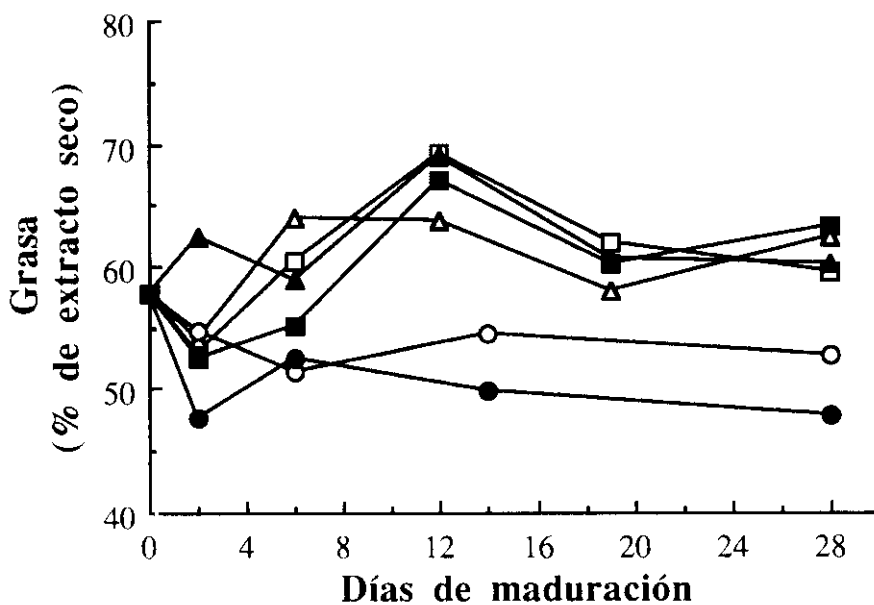


Figura III.11.- Evolución del contenido lipídico total (% de extracto seco) de los lotes de embutidos madurados durante 28 días: ( □ ) Control; ( ■ ) Lote 3; ( △ ) Lote 90; ( ▲ ) Lote 180; ( ○ ) Lote 250; ( ● ) Lote 500.

la cantidad de grasa determinada en el lote elaborado con 500 unidades de lipasa pancreática fue más baja que en el control e, igualmente, menor que en el resto de los lotes experimentales elaborados con menor cantidad de enzima (compárense los datos de la tabla III.1 y la figura III.11), cuando deberían ser similares. Este hecho se puede atribuir, por una parte, a la actividad de la lipasa pancreática que, además de escindir los enlaces éster de las posiciones sn1 y sn3 de los triglicéridos ataca también la posición sn1 de los fosfolípidos, dando lugar al correspondiente lisofosfátido con un ácido graso en la posición sn2 (Christie, 1982), de mayor polaridad y que por lo tanto puede perderse, al menos parcialmente, con la fase acuosa. Por otra parte, este menor contenido de grasa de los lotes 250 y 500 puede atribuirse también a que la cantidad de lipasa añadida fue tan elevada que se generó una gran tasa de monoglicéridos, de mayor polaridad que los triglicéridos, que no se extrajeron en su totalidad, permaneciendo en la interfase de las fases acuosa y clorofórmica, donde se localiza, además, la proteína miofibrilar con la que los monoglicéridos pueden interaccionar siendo, en consecuencia, difíciles de liberar. Como ya se ha señalado en el capítulo de material y métodos, la utilización del método de Hanson y Olley (1963) es muy recomendable si se quiere recuperar de las muestras la totalidad de los lípidos (incluidos los de mayor polaridad) y proceder a una caracterización posterior de los mismos, pero, realmente, este método está diseñado para tejidos en los que el contenido de glicéridos parciales es muy bajo. Finalmente, junto a estas dos posibilidades existe una tercera, derivada de la actividad lipásica de las bacterias lácticas que principalmente recae sobre los glicéridos parciales (Stadhouders y Veringa, 1973; Stadhouders, 1974; Sanz y col., 1988), con lo que se liberaría glicerol en mayor o menor medida, resultante de la hidrólisis de los monoglicéridos acumulados. El glicerol es miscible con el agua en todas las proporciones y, por lo tanto, no se determinaría junto a la grasa. Este problema de extracción se podría haber solucionado, en parte, reextrayendo las interfases, pero sólo se apreció de forma manifiesta en los dos últimos lotes, los de mayor cantidad de lipasa añadida. No obstante, el efecto de la lipasa en la tasa de triglicéridos se

Tabla III.1. Contenido de grasa de los embutidos elaborados con 500 unidades de lipasa pancreática (lote 500) durante el proceso madurativo

<u>Día</u>	<u>g/100 g peso fresco</u>		<u>g/100 g extracto seco</u>	
	<u>Control</u>	<u>Lote 500</u>	<u>Control</u>	<u>Lote 500</u>
0	22,69	22,69	57,90	57,90
2	22,41	21,00	55,84	46,00
6	26,72	23,55	63,42	56,15
14	36,25	23,94	61,48	49,67
28	35,94	26,09	60,17	44,64

deduce también de la evolución de dicha fracción lipídica que se recoge en la figura III.13 (parte inferior) en la que claramente se observa el descenso de triglicéridos en función de la cantidad de enzima añadida.

Por lo que respecta a los resultados obtenidos puede decirse, en términos generales, que el contenido de grasa de los embutidos depende de la formulación. Por ello no es de extrañar que en la bibliografía consultada para la realización de este trabajo se encuentren cifras, en términos de peso fresco, comprendidas en un amplio intervalo, desde un 15,12% observado en el Lebanon bologna hasta un 42% en el pepperoni (Acton y Dick, 1976). En términos de extracto seco, Goussault y Girard (1976) han registrado contenidos finales del 76,2% en el salchichón francés frente al 35,4% citado para el Lebanon bologna (Ziegler y col., 1987). Los resultados obtenidos en el presente trabajo se encuentran, pues, dentro de estos márgenes y son similares a los registrados en salami español (Melgar y col., 1990), belga (Demeyer y col., 1974; Vandekerckhove y Demeyer, 1975), alemán (Lücke, 1984), húngaro (Incze, 1987) y americano (Acton y Dick, 1976), así como en salchichón de distintas procedencias (Goussault y Girard, 1976; Ferrer y Arboix, 1986; Beriain y col., 1993) y otros embutidos crudos curados, como embutidos griegos (Samelis y col., 1993), chorizos españoles (Domínguez y col., 1989; Melo y col., 1986) y portugueses (Astiasarán y col., 1990, 1992).

### **III.6.- FRACCIONAMIENTO DE LOS LIPIDOS TOTALES POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA**

Con el objeto de estudiar los fenómenos lipolíticos en los distintos lotes de embutidos experimentales, el extracto lipídico total obtenido se fraccionó por cromatografía en capa fina (TLC) de gel de sílice, para lo que se siguió la metodología descrita en el apartado II.3.3.6. El revelado de las placas cromatográficas puso de manifiesto la presencia de 8-9 manchas cromatográficas correspondientes a otras tantas sustancias en todos los

extractos analizados. Según se señala también en el citado apartado, se identificaron de acuerdo con sus respectivos  $R_f$  y su comportamiento frente a reactivos generales y específicos, además de por el comportamiento de patrones cromatografiados en las mismas condiciones. Seis de ellas fueron caracterizadas como correspondientes a monoglicéridos ( $R_f=0,01$ ), diglicéridos ( $R_f=0,12$ ), colesterol libre ( $R_f=0,17$ ), ácidos grasos libres ( $R_f=0,26$ ), triglicéridos ( $R_f=0,80$ ) e hidrocarburos y ésteres del colesterol ( $R_f=0,96$ ). Estos compuestos son los que habitualmente se detectan en la carne de distintos animales (Chang-Haan y Yeon-Hee, 1982). Dos o tres manchas con  $R_f$  entre el del colesterol y el de los ácidos grasos libres no fueron identificadas. La lectura de las placas se llevó a cabo por densitometría a 390 nm y la cuantificación de las manchas se realizó mediante la utilización de las gráficas patrón de las sustancias identificadas (figuras II.2, II.3, II.4 y II.5 del capítulo de material y métodos).

Para seguir la evolución de la lipólisis en los embutidos experimentales se tuvieron en cuenta las manchas correspondientes a los monoglicéridos, diglicéridos, ácidos grasos libres y triglicéridos. En el sistema de cromatografía en capa fina utilizado, la movilidad de los monoglicéridos es muy baja, por lo que quedaron localizados prácticamente en el origen de las placas, junto con los fosfolípidos. Por esta razón, ambos tipos de compuestos se cuantificaron conjuntamente y, considerando que los lípidos polares sufren sólo pequeñas variaciones a lo largo del proceso madurativo de los embutidos y, además, en fases tardías (Demeyer y col., 1974), a efectos prácticos, los cambios que se observaron en esta mancha se atribuyeron exclusivamente a los monoglicéridos.

Como se ha señalado ya repetidas veces a lo largo de este trabajo, es un hecho bien conocido que en los embutidos crudos curados tienen lugar a lo largo de la maduración importantes cambios en el componente lipídico debidos a la actuación de lipasas de distinta procedencia (Demeyer y col, 1974; Melgar

y col., 1990; Masana y Lasta, 1992). Las lipasas (entre ellas la lipasa pancreática) se caracterizan por hidrolizar con preferencia los triglicéridos, en segunda instancia los diglicéridos y mucho más débilmente los monoglicéridos (Whitaker, 1972).

En las figuras III.12 y III.13 se observa la evolución del contenido de **triglicéridos**, expresado en términos de extracto seco (g/100 g E.S.) en los salchichones experimentales madurados durante 14 y 28 días respectivamente. Como era de esperar, los triglicéridos fueron los lípidos mayoritarios de los embutidos, con cantidades iniciales de alrededor de 44-52 g/100 g E.S. En los embutidos elaborados sin la adición de lipasa pancreática sólo se observó una ligera disminución del contenido de triglicéridos a lo largo de la maduración. Este efecto no es muy manifiesto pero, teniendo en cuenta los valores iniciales de triglicéridos se puede deducir que en el control mostrado en la figura III.12 (valor inicial 43,8 g/100 g E.S. y valor final 41,0 g/100 g E.S.) se produjo un descenso del 6,4% en 14 días de maduración. Del mismo modo, en el control recogido en la figura III.13 (valor inicial 51,7 g/100 g E.S. y valor final 43,2 g/100 g E.S.) se calculó una disminución de un 16,4%.

Respecto a los lotes de embutidos elaborados con lipasa pancreática no se registraron diferencias notables en relación con los controles en los lotes 3 (de 28 días de maduración) (Fig. III.13), 10, 30 y 40 (de 14 días de maduración) (Fig. III.12), ya que los valores finales de triglicéridos que se obtuvieron fueron bastante similares. Sin embargo, cuando la concentración de lipasa añadida fue mayor de 40 unidades (lote 60, recogido en la figura III.12 y lotes 90, 180, 250 y 500, recogidos en la figura III.13), sí que se puso claramente de manifiesto el efecto de la enzima y, así, se observa que a medida que se añadía más lipasa, la cantidad final de triglicéridos era proporcionalmente menor, calculándose porcentajes de disminución en la tasa de triglicéridos de estos lotes del 12,7%, 30,1%, 46,5%, 65,06% y 71,7% respectivamente. Además, se pudo apreciar que el descenso fue mucho más acusado en las primeras etapas

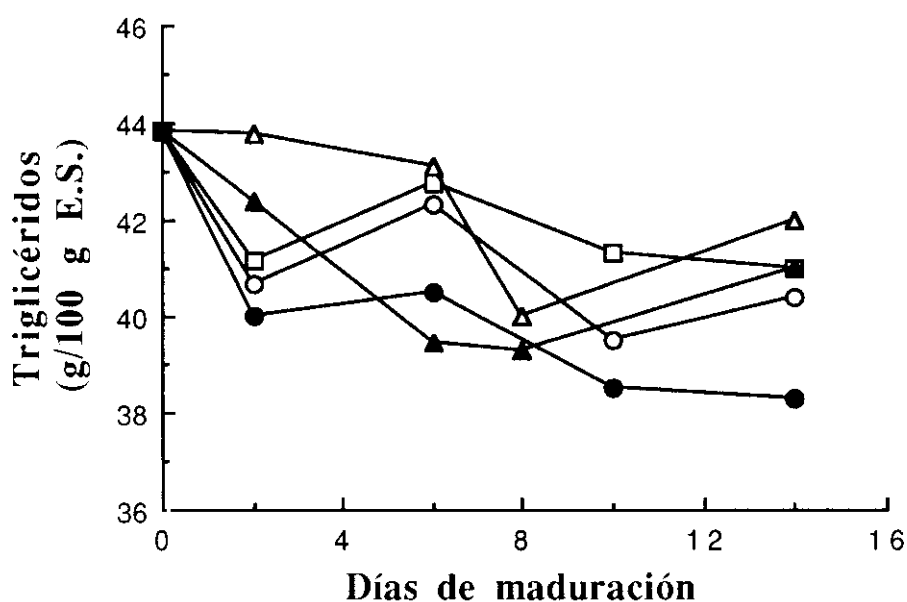


Figura III.12.- Evolución del contenido de triglicéridos (g/100 g E.S.) de los lotes de embutidos madurados durante 14 días: ( □ ) Control; ( △ ) Lote 10; ( ▲ ) Lote 30; ( ○ ) Lote 40; ( ● ) Lote 60.

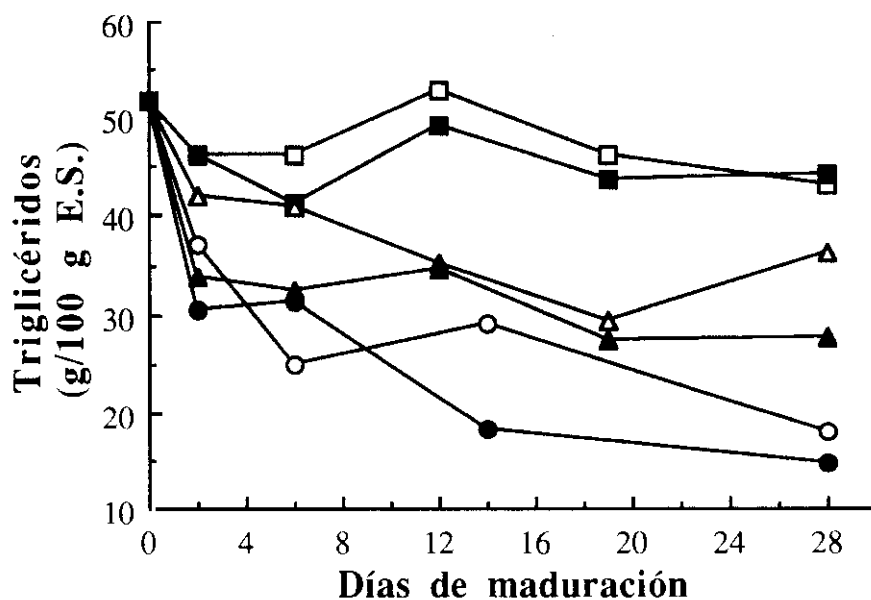


Figura III.13.- Evolución del contenido de triglicéridos (g/100 g E.S.) de los lotes de embutidos madurados durante 28 días: ( □ ) Control; ( ■ ) Lote 3 ( △ ) Lote 90; ( ▲ ) Lote 180; ( ○ ) Lote 250; ( ● ) Lote 500 .

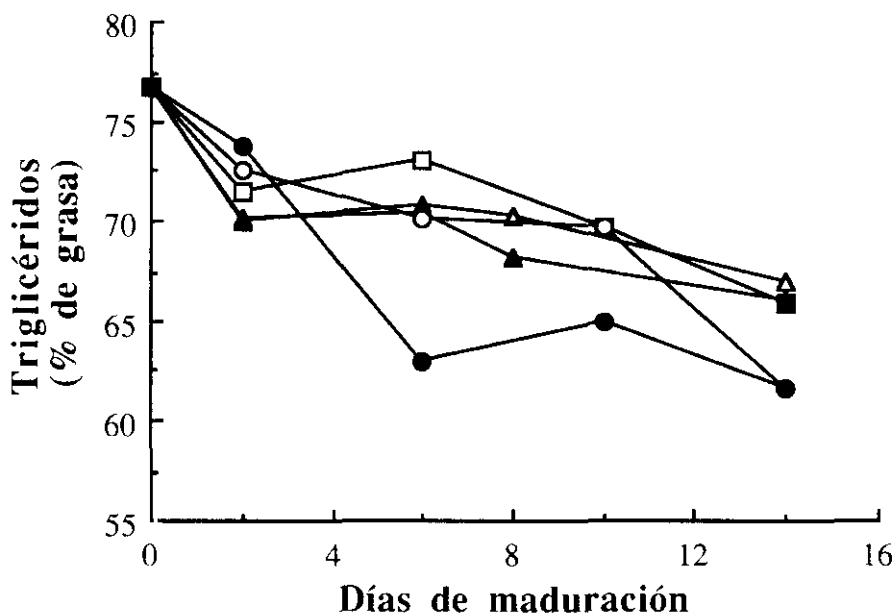


Figura III.14.- Evolución del contenido de triglicéridos (% de grasa) de los lotes de embutidos madurados durante 14 días: ( □ ) Control; ( △ ) Lote 10; ( ▲ ) Lote 30; ( ○ ) Lote 40; ( ● ) Lote 60.

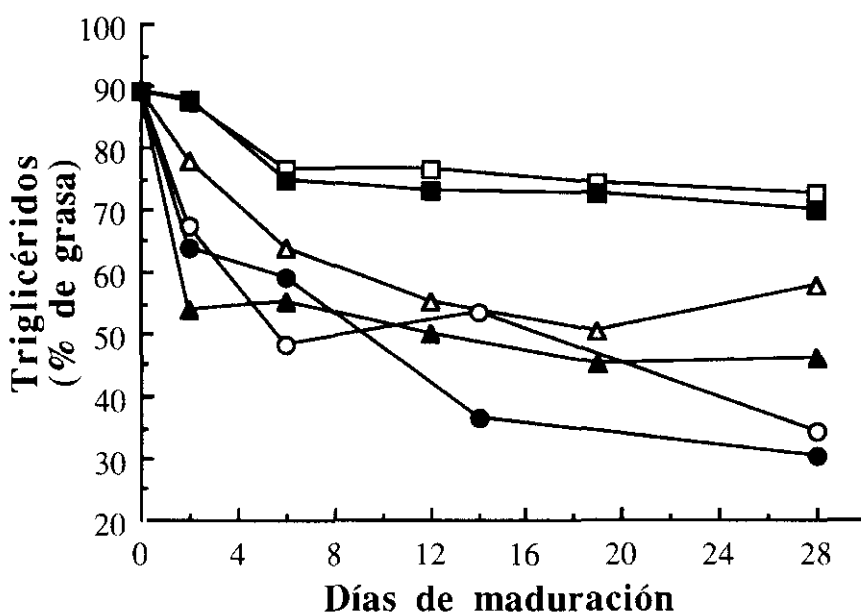


Figura III.15.- Evolución del contenido de triglicéridos (% de grasa) de los lotes de embutidos madurados durante 28 días: ( □ ) Control; ( ■ ) Lote 3 ( △ ) Lote 90; ( ▲ ) Lote 180; ( ○ ) Lote 250; ( ● ) Lote 500 .

del proceso, es decir, durante la fase fermentativa. Este hecho se observó de una forma más clara en los tres lotes que contenían las mayores cantidades de enzima (180, 250 y 500 unidades) (Fig. III.13).

Tomando como referencia el contenido lipídico total (Fig. III.14 y III.15), los triglicéridos constituyeron en la masa preparada para embutir alrededor de un 80-90% de dicha fracción y experimentaron en los salchichones controles una reducción progresiva hasta valores finales en torno al 70%. El porcentaje de triglicéridos respecto al total lipídico al final del proceso en los lotes elaborados con lipasa pancreática osciló entre el 70 y el 30%, observándose las mayores diferencias en los embutidos elaborados con mayores cantidades de enzima. En el lote con la cantidad de lipasa más elevada (500 unidades) los triglicéridos sufrieron una merma de más de las 2/3 partes de su contenido inicial.

La evolución del contenido de **diglicéridos** de los distintos lotes experimentales se refleja en las figuras III.16 y III.17 en término de extracto seco y III.17 y III.18 en porcentaje de grasa. Estos compuestos, que se detectaron en cantidades traza en la masa preparada para embutir, mostraron en los embutidos controles una evolución ascendente a partir del octavo-décimo día de maduración desde valores iniciales de 0,013-0,028 g/100 g E.S. hasta alcanzar en el producto final cifras en torno a 1 g/100 g E.S. Esta fracción sí que refleja mejor que la de triglicéridos la lipólisis "natural" (observada en los lotes elaborados sin la adición de lipasa pancreática) de los embutidos que puede deberse a lipasas ajenas a la carne, es decir, de origen microbiano (Lubienicki v. Schelhorn, 1972; Palumbo y Smith, 1977; Paleari Bianchi, 1985; Demeyer y col., 1992) o a lipasas procedentes del propio músculo, como recientemente han apuntado García y col. (1992).

En todos los embutidos elaborados con lipasa pancreática se registró, además de un contenido final de diglicéridos mayor que en los controles, un

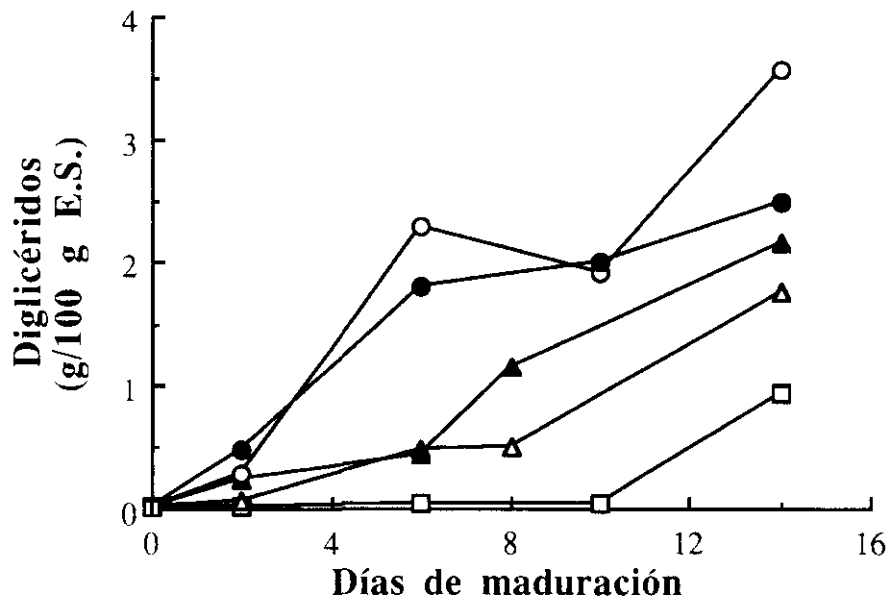


Figura III.16.- Evolución del contenido de diglicéridos (g/100 g E.S.) de los lotes de embutidos madurados durante 14 días: ( □ ) Control; ( △ ) Lote 10; ( ▲ ) Lote 30; ( ○ ) Lote 40; ( ● ) Lote 60.

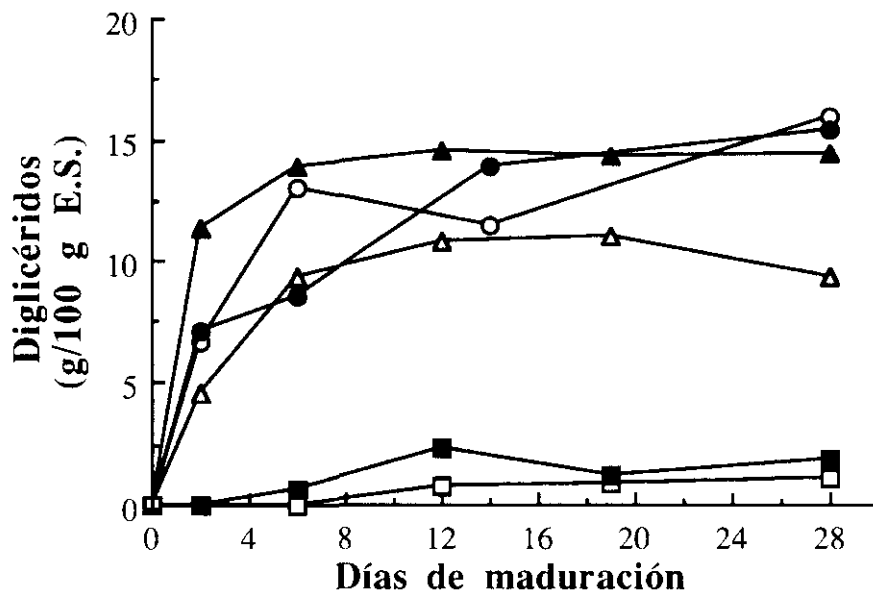


Figura III.17.- Evolución del contenido de diglicéridos (g/100 g E.S.) de los lotes de embutidos madurados durante 28 días: ( □ ) Control; ( ■ ) Lote 3; ( △ ) Lote 90; ( ▲ ) Lote 180; ( ○ ) Lote 250; ( ● ) Lote 500.

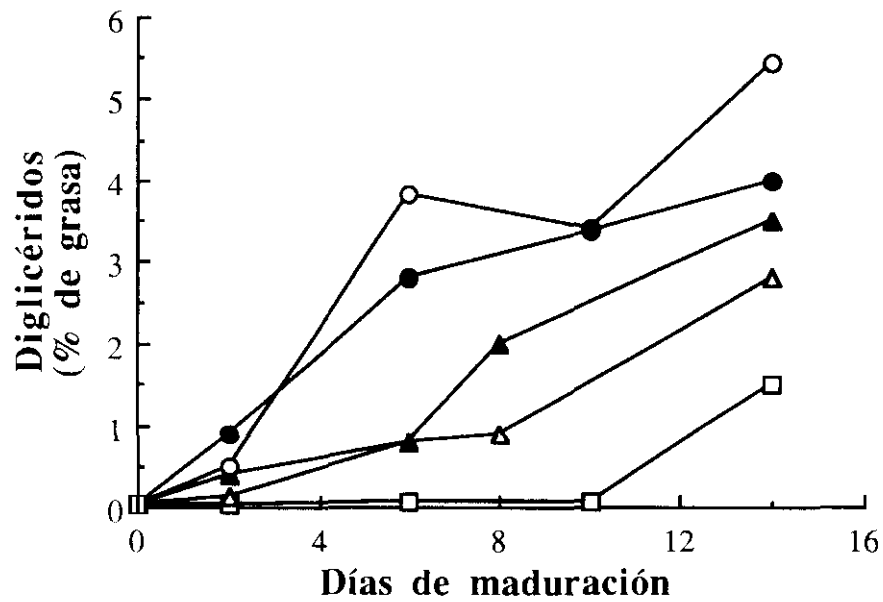


Figura III.18.- Evolución del contenido de diglicéridos (% de grasa) de los lotes de embutidos madurados durante 14 días: ( □ ) Control; ( △ ) Lote 10; ( ▲ ) Lote 30; ( ○ ) Lote 40; ( ● ) Lote 60.

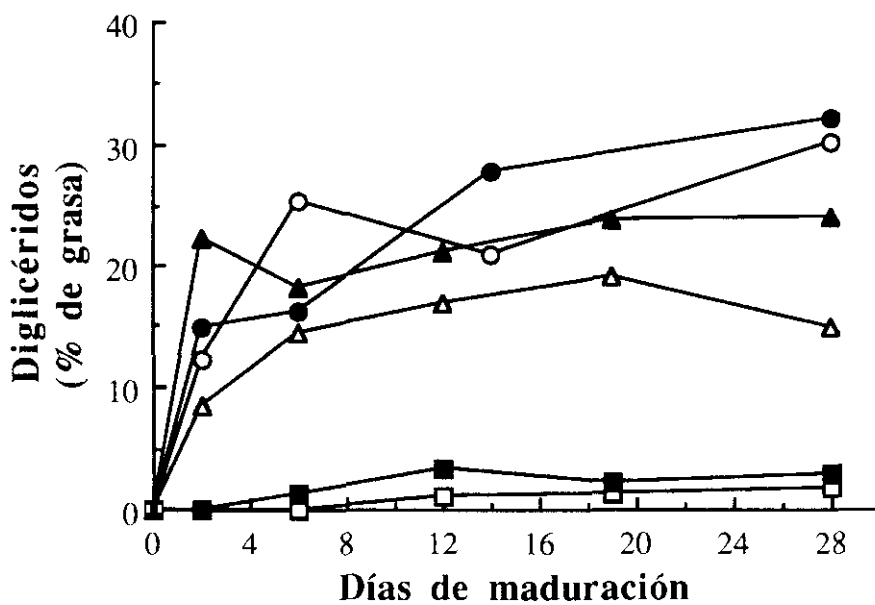


Figura III.19.- Evolución del contenido de diglicéridos (% de grasa) de los lotes de embutidos madurados durante 28 días: ( □ ) Control; ( ■ ) Lote 3; ( △ ) Lote 90; ( ▲ ) Lote 180; ( ○ ) Lote 250; ( ● ) Lote 500.

aumento más temprano de los mismos. En el lote 3 (Fig. III.17) este efecto se mostró de forma menos manifiesta, ya que los valores de la fracción diglicéridos fueron sólo ligeramente superiores a las de un embutido sin lipasa. En el resto de los lotes sí que se observó un incremento claro de la tasa de diglicéridos en relación con los controles. Sin embargo, se apreciaron dos tipos distintos de evolución. El primer tipo corresponde al lote 3 de la figura III.17 y a los de la figura III.16 (lotes 10, 30, 40 y 60), en los que los niveles de diglicéridos aumentaron gradualmente desde el principio de la maduración hasta alcanzar las tasas máximas al final del proceso. El segundo tipo de evolución (la de los lotes representados en la figura III.17, excepto el 3) corresponde a los embutidos elaborados con 90, 180, 250 y 500 unidades de lipasa pancreática, en los que se observó un aumento muy acusado de estos compuestos durante los 4-6 primeros días del proceso madurativo, para estabilizarse o aumentar después más lentamente. Estos lotes fueron los que se elaboraron con mayores cantidades de lipasa pancreática y el aumento de los diglicéridos en la fase fermentativa concuerda con la disminución que se observó en la tasa de triglicéridos (Fig. III.13 y III.15). Es posible que al acumularse una gran cantidad de diglicéridos (hay que tener en cuenta que, partiendo de cifras prácticamente inapreciables, en estos lotes se obtuvieron valores finales de 9-16 g /100 g E.S.), se produzca una inhibición de la enzima por acumulación de los productos resultantes de la reacción.

Las variaciones del contenido de diglicéridos en relación con el contenido lipídico total se recogen en las figuras III.18 y III.19. Quizás en este caso se aprecie mejor el grado de lipólisis que se produjo al añadir las diferentes concentraciones de lipasa pancreática. Los diglicéridos representaron un porcentaje muy bajo (entre el 0,025% y el 0,05%) del componente graso de la masa fresca y sufrieron un incremento muy elevado en los lotes experimentales elaborados con lipasa pancreática, llegando a constituir desde un 3,0% en el lote 3 hasta un 32,2% en el lote 500, frente a los valores finales próximos al 2% que presentaron los embutidos utilizados como control.

En las figuras III.20 y III.21 y III.22 y III.23 se muestran los cambios en el contenido de **monoglicéridos** en los distintos lotes de embutidos respecto a extracto seco y grasa total respectivamente. En los controles, esta fracción experimentó ligeras variaciones a lo largo de la maduración, duplicando como máximo su cantidad inicial, desde 2-3 g /100 g E.S. en la masa fresca hasta aproximadamente 4 g/100 g E.S. en el producto final. Este moderado aumento fue constante durante los primeros 10-12 días del proceso, para luego estabilizarse o incluso disminuir ligeramente hacia el final, por lo que no existieron grandes diferencias en las tasas finales observadas en los embutidos controles con distintos periodos madurativos. Entre los embutidos con lipasa pancreática, los lotes 3, 10, 30 y 40 se comportaron de forma parecida a los controles, es decir, no se apreció la adición de la enzima. A tal efecto, en las figuras III.20 y III.21 se puede observar que las gráficas correspondientes a los lotes mencionados se entrecruzan o superponen. Sin embargo, cuando la cantidad de lipasa añadida fue superior a 40 unidades, sí que se observó la actividad de la enzima. El lote 60 (Fig. III.20) mostró ya cifras superiores a los anteriormente mencionados (5,6 g/100 g E.S. al cabo de 14 días de maduración) y en el resto de los lotes (Fig. III.21) los valores finales duplicaron, en todos los casos, a los de los embutidos control, con cifras del orden de 7-8 g/100 g E.S. al final del periodo madurativo.

Similares resultados se deducen de las gráficas en relación con el contenido lipídico total. Los monoglicéridos registraron en los embutidos controles unas oscilaciones entre un 3,9% (en los lotes de 14 días) y un 5,5% (en los de 28 días) inicial y un 6,0% y un 7,2% final respectivamente. Los lotes 3, 10, 30 y 40 mostraron tasas finales similares, del orden del 6-7% mientras que en el resto de los embutidos elaborados con lipasa pancreática los valores oscilaron entre el 9,0% (en el lote 60) y cifras próximas al 14-15% (en los lotes 250 y 500 respectivamente) de la grasa total del producto final.

En definitiva, las variaciones experimentadas por los distintos glicéridos en los salchichones controles coinciden con la evolución observada en otros embutidos por distintos autores (Cerise y col., 1973; Demeyer y col., 1974). Como era de suponer, en los lotes elaborados con lipasa pancreática estos cambios fueron más acentuados, especialmente en los elaborados con 90, 180, 250 y 500 unidades de enzima. Se puede decir, en conclusión, que la lipasa pancreática ocasionó una mayor acumulación de diglicéridos que de monoglicéridos, lo que indica que esta enzima hidroliza con preferencia los triglicéridos y a continuación los diglicéridos y monoglicéridos. Ello que concuerda con las observaciones anteriormente citadas de Whitaker (1972).

Los **ácidos grasos libres** se detectaron en la masa fresca en cantidades ligeramente superiores a los diglicéridos, con cifras de unos pocos mg/100 g E.S. En las figuras III.24 y III.25 se puede apreciar la evolución de su contenido en términos de extracto seco en los embutidos experimentales madurados durante 14 y 28 días respectivamente, mientras que en las figuras III.26 y III.27 se muestran los resultados en términos de porcentaje de grasa. En los salchichones controles, la cantidad de ácidos grasos libres se incrementó progresivamente a lo largo de la maduración, evidenciando una importante lipólisis. Al final del proceso se registraron cifras de 0,7 y algo menos de 2 g/100 g E.S. al cabo de 14 y 28 días, respectivamente. Esto corresponde a incrementos de unas 30-50 veces en relación con las tasas iniciales observadas (0,028 y 0,045 g/100 g E.S. respectivamente).

La tasa de ácidos grasos libres en los lotes de embutidos elaborados con hasta 60 unidades de enzima y madurados durante 14 días duplicó y triplicó los valores finales registrados en los controles, con cifras máximas de 2,5 g /100 g E.S en el lote 40. El lote 3, que contenía la menor cantidad de enzima, registró tasas mayores, en torno a 3 g/100 g E.S., probablemente debido a que su periodo madurativo fue más prolongado (el doble que el de los lotes elaborados con 10, 30, 40 y 60 unidades de lipasa pancreática). Lógicamente,

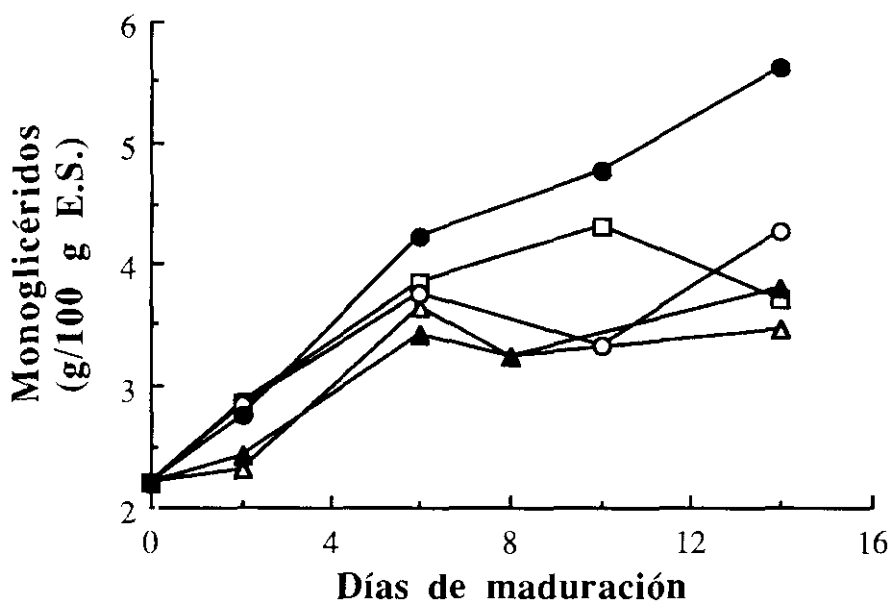


Figura III.20.- Evolución del contenido de monoglicéridos (g/100 g E.S.) de los lotes de embutidos madurados durante 14 días: (□) Control; (△) Lote 10; (▲) Lote 30; (○) Lote 40; (●) Lote 60.

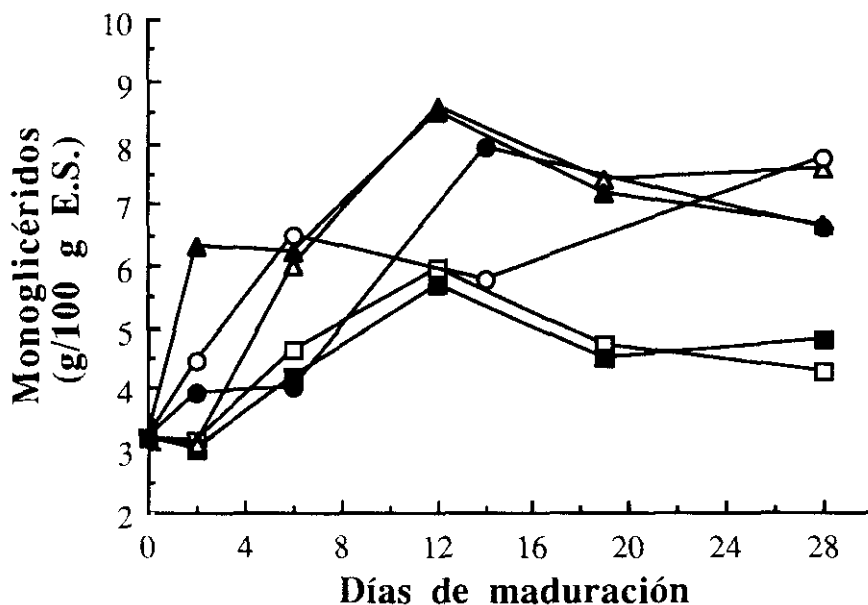


Figura III.21.- Evolución del contenido de monoglicéridos (g/100 g E.S.) de los lotes de embutidos madurados durante 28 días: (□) Control; (■) Lote 3; (△) Lote 90; (▲) Lote 180 (○) Lote 250; (●) Lote 500.

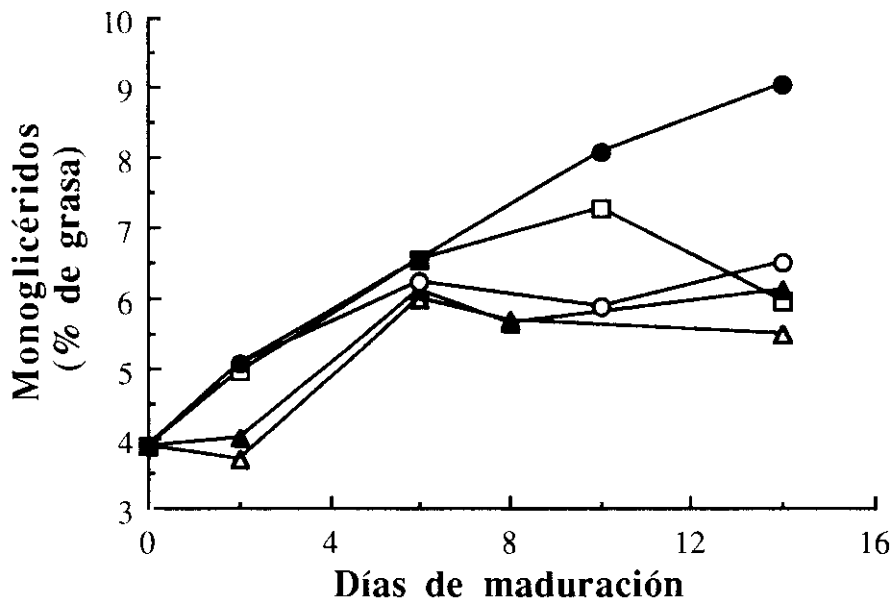


Figura III.22.- Evolución del contenido de monoglicéridos (% de grasa) de los lotes de embutidos madurados durante 14 días: (□) Control; (△) Lote 10; (▲) Lote 30; (○) Lote 40; (●) Lote 60.

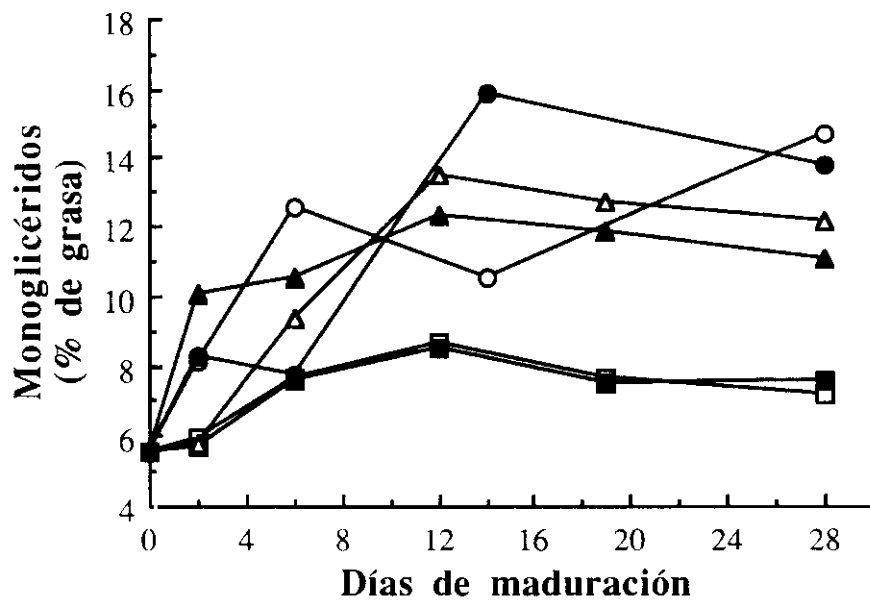


Figura III.23.- Evolución del contenido de monoglicéridos (% de grasa) de los lotes de embutidos madurados durante 28 días: (□) Control; (■) Lote 3; (△) Lote 90; (▲) Lote 180 (○) Lote 250; (●) Lote 500.

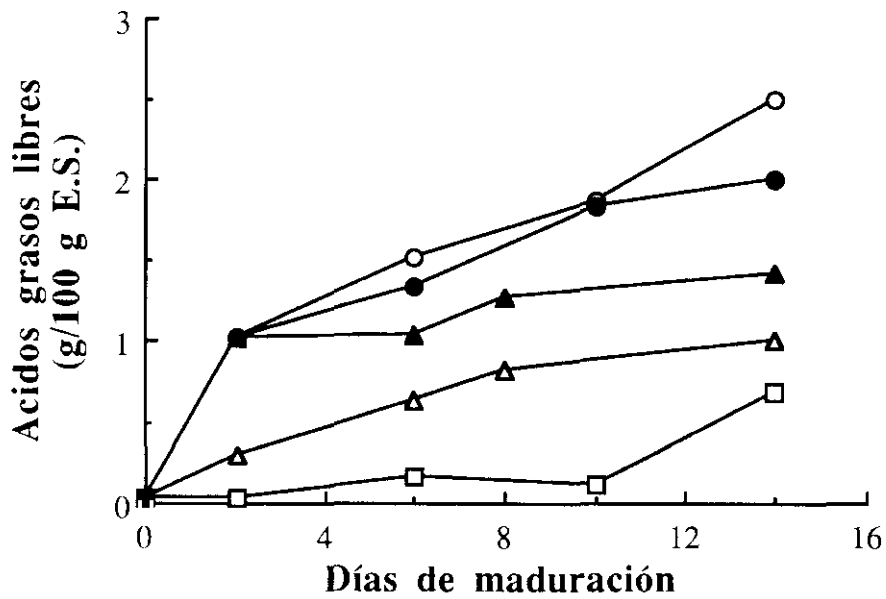


Figura III.24.- Evolución del contenido de ácidos grasos libres (g/100 g E.S.) de los lotes de embutidos madurados durante 14 días: (□) Control; (△) Lote 10; (▲) Lote 30 (○) Lote 40; (●) Lote 60.

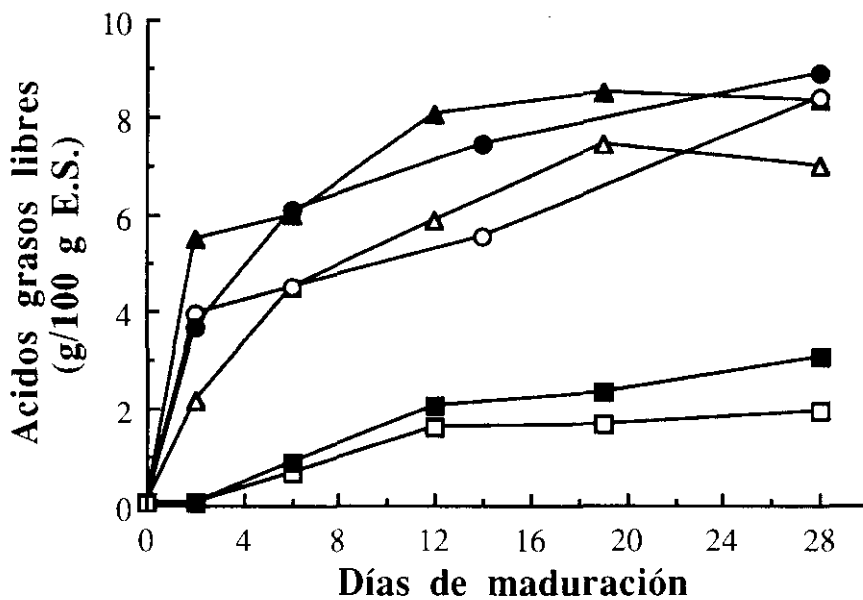


Figura III.25.- Evolución del contenido de ácidos grasos libres (g/100 g E.S.) de los lotes de embutidos madurados durante 28 días: (□) Control; (■) Lote 3; (△) Lote 90; (▲) Lote 180; (○) Lote 250; (●) Lote 500.

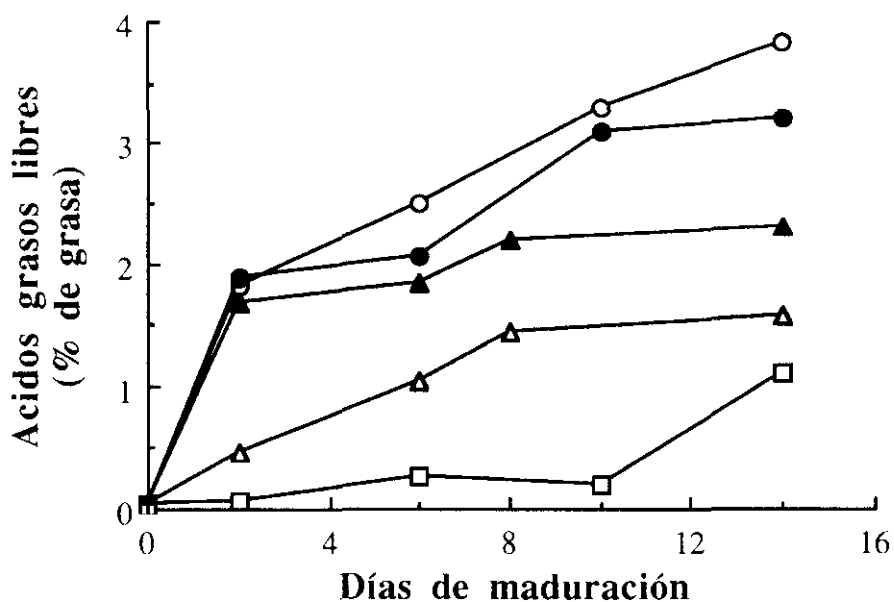


Figura III.26.- Evolución del contenido de ácidos grasos libres (% de grasa) de los lotes de embutidos madurados durante 14 días: (□) Control; (△) Lote 10; (▲) Lote 30; (○) Lote 40; (●) Lote 60.

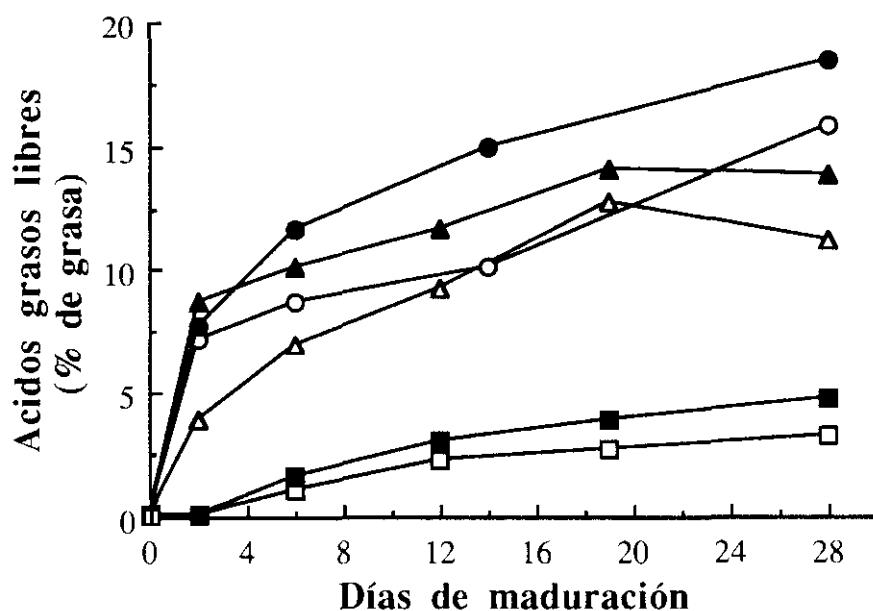


Figura III.27.- Evolución del contenido de ácidos grasos libres (% de grasa) de los lotes de embutidos madurados durante 28 días: (□) Control; (■) Lote 3; (△) Lote 90; (▲) Lote 180; (○) Lote 250; (●) Lote 500.

al igual que en el caso de monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos las mayores diferencias se observaron en los lotes 180, 250 y 500, cuyo contenido final de ácidos grasos libres se situó próximo a los 9 g/100 g E.S. También en este caso el lote elaborado con 90 unidades de enzima mostró un comportamiento intermedio, con tasas de 7 g/100 g E.S. al final del proceso. Esta evolución representó un incremento en los lotes elaborados con lipasa que osciló entre 40 y 222 veces el contenido inicial. Como también se puede observar en las figuras, y en concordancia con lo ocurrido con los glicéridos, el máximo incremento de la cantidad de ácidos grasos libres se produjo durante la fase de fermentación, es decir, durante los primeros 2-3 días del proceso, lo que está de acuerdo con las observaciones de otros autores (Cantoni y col., 1966; Giolitti, 1967; Melgar y col., 1990), que señalan que la aparición de ácidos grasos libres suele ser precoz en la maduración de los embutidos crudos curados, para luego aumentar su cantidad de forma más paulatina.

En el total de la fracción lipídica de la masa antes de embutir, los ácidos grasos libres representaron un 0,05-0,08%, valores que se incrementaron hasta cifras del orden del 1% en los embutidos controles madurados durante 14 días y ligeramente superiores al 3% en los madurados durante 28 días. Todos los embutidos elaborados con lipasa pancreática presentaron porcentajes finales mayores, desde un 4,8% en el lote 3 hasta el 18,52% determinado en el lote 500, lo que representó unos niveles entre 64 y 246 veces mayores que los iniciales, incrementos muy similares a los hallados en términos de extracto seco.

El contenido inicial de ácidos grasos libres observado por los distintos autores es muy variable en los diversos tipos de embutidos y oscila entre el 0,08% citado por Lois (1985) en chorizo y el 1,7% observado por Paleari Bianchi y col. (1985) en el salami, expresados en gramos de ácido oleico/100 gramos de grasa. Melgar y col. (1990) han descrito valores del 0,68% en salami y Ferrer y Arboix (1986) 1,3% en el salchichón de Vich en los mismos

términos (g/100 g de grasa). De acuerdo con las observaciones de Domínguez (1988), estas diferencias es lógico que se deban al tiempo transcurrido entre el sacrificio del animal y la utilización de la grasa en la elaboración del embutido, tiempo durante el que ésta puede sufrir ya fenómenos de tipo lipolítico derivados fundamentalmente de la actividad de las lipasas musculares.

Los valores originales observados en este trabajo se encuentran próximos a los datos recogidos por Lois (1985) en chorizo. Las cifras finales en torno a 0,7-3 g/100 g E.S. (1,1-4,8 g/100g de grasa) registradas en los controles y algunos lotes elaborados con lipasa pancreática se encuentran dentro del amplio margen citado para estos productos, desde 0,5-1,2 g/100 g de grasa en chorizo portugués (Melo y col., 1986) hasta cifras de 5,9 g/100 g de grasa observadas en salami por Melgar y col. (1990) y Paleari Bianchi y col. (1985). Demeyer y col. (1974) han obtenido en salami belga valores próximos al 5% del total de ácidos grasos del producto final, Cerise y col. (1973) ha descrito en salami alemán tasas de 2-3 g/100 g de grasa y Lois y col. (1987) de alrededor de 5 g/100 g de grasa en chorizo al cabo de 100 días de maduración. Cifras inferiores a éstas han obtenido León Crespo y col. (1977; 1985) en salchichón y chorizo respectivamente y García y col., (1992) en salchichones con un periodo de maduración similar (1,2-1,6 g/100 g E.S.).

Las cifras finales de ácidos grasos libres (8-9 g/100 g E.S.) que se detectaron en los embutidos con las cantidades mayores de lipasa ponen de manifiesto que en los salchichones experimentales tuvo lugar una lipólisis muy intensa, originándose tasas muy elevadas, que sólo se describen en la bibliografía relativa a embutidos madurados durante periodos muy prolongados, como es el caso del ya previamente citado salchichón de Vich (Ferrer y Arboix, 1986), en el que se señalan cifras del 10,60% en términos de ácido oleico tras 12 meses de maduración. Es bien sabido que sólo los embutidos secados al aire durante largos periodos de maduración, como el salami húngaro presentan a menudo más del 5% del peso del embutido en

forma de ácidos grasos libres (Nagy y col. 1989).

Tomando como referencia embutidos españoles en los que se han determinado las tasas de ácidos grasos libres, como el salchichón de Vich, en el que los autores (Ferrer y Arboix, 1986) señalan valores del 10,6% tras 12 meses de maduración o chorizo artesanal de 100 días de maduración, que presenta tasas del 5% respecto a extracto lipídico (Lois y col., 1987), se puede decir que, en relación con el primer ejemplo citado, esos valores se consiguieron en los embutidos experimentales al cabo de 28 días de maduración cuando se añadieron entre 180 y 500 unidades de lipasa pancreática. Del mismo modo, los valores citados en el segundo ejemplo se superaron en 28 días al adicionar 90 unidades de la enzima.

Como resumen de los fenómenos lipolíticos observados en los embutidos experimentales, se puede señalar que en todos los lotes elaborados con lipasa pancreática se detectó una lipolisis más intensa que en los controles, más importante a medida que aumentó la cantidad de enzima añadida a los embutidos. Esta evolución se mantuvo hasta que se añadieron 180 unidades de lipasa. La adición de cantidades prácticamente 3 veces mayores no produjo los efectos proporcionales esperados. Se apreció claramente un descenso continuo de los triglicéridos durante el proceso madurativo, con el correspondiente aumento de ácidos grasos libres y diglicéridos y, menos marcado, de monoglicéridos. Estas observaciones coinciden con otros trabajos sobre la lipolisis en embutidos y otros productos cárnicos curados (Alford y col., 1971; Cerise y col., 1973; Demeyer y col., 1974; Vandekerckove y Demeyer, 1975; León Crespo y Millán, 1977; León Crespo y col., 1985).

Coincidiendo con las opiniones de otros autores (Rozier, 1969; Wardlaw y col., 1973; Mendoza y col., 1983), el estufaje o fermentación fue una de las etapas más delicadas y decisivas para los fenómenos lipolíticos. Según Cerise y col. (1973) es principalmente en esta etapa del proceso madurativo cuando se

produce la liberación enzimática específica de ácidos grasos que posteriormente se transformarán por oxidación en compuestos volátiles cruciales para el desarrollo del sabor y aroma de los embutidos. En todos los lotes elaborados con lipasa pancreática, el máximo acúmulo de los productos de la lipólisis se alcanzó en torno a la segunda semana de maduración, tras lo cual los niveles se estabilizaron, aumentaron mucho más suavemente o incluso disminuyeron, fenómeno que se puede atribuir a la actividad metabólica de la flora microbiana o a la transformación química de los ácidos grasos en carbonilos (Alford y col, 1971; Debevere y col., 1976; Naes y col., 1992).

En los embutidos controles no se apreció el incremento explosivo de la tasa de ácidos grasos libres durante la fase fermentativa que se observó en los lotes elaborados con lipasa. En estos últimos, dicho fenómeno se debió probablemente a que el pH inicial de la masa (ligemente inferior a 6,0) y las condiciones de temperatura (18-22 °C) establecidas en esta fase fermentativa no distaban mucho de las condiciones óptimas de actuación de la lipasa pancreática (37° C y pH 7,0), por lo que su actividad, aunque no la máxima, todavía era importante. Al modificarse el pH y la temperatura del embutido durante el proceso madurativo, dicha enzima continuó actuando, si bien de forma más moderada. Este hecho, además, parece corroborado porque al triplicar prácticamente la concentración de 180 unidades de lipasa añadida no se observó una respuesta proporcional en la acumulación de ácidos grasos libres. El descenso de actividad de las enzimas es una circunstancia favorable que permite evitar una lipólisis excesiva que acarrearía una casi total degradación de los lípidos del embutido, lo que repercutiría desfavorablemente en la calidad final del producto.

Así pues, de las experiencias realizadas se deduce que durante la fase de fermentación tuvo lugar la máxima actividad de la lipasa pancreática, que reforzó la de las micrococáceas durante dicha etapa, en la que las condiciones de temperatura y pH fueron más próximas a las óptimas. Se sabe que sobre la

actividad y estabilidad de las enzimas influyen, además de la temperatura y el pH, distintos factores: la actividad de agua del producto, la concentración y el tipo de sustrato, la presencia de sales (Adler-Nissen, 1986; Adams, 1991; Greco y col. 1991). Teniendo en cuenta su pH óptimo de actuación, la lipasa pancreática se puede considerar una lipasa neutra y este tipo de lipasas mantienen su conformación activa a las temperaturas empleadas en el proceso (Tombs, 1985). Asimismo, la presencia de sales neutras como el NaCl aumentan su estabilidad (Kristjánsson y Kinsella, 1991), aunque concentraciones muy elevadas pueden llegar a producir su inhibición.

La  $a_w$  es un parámetro clave en la actividad enzimática. La  $a_w$  de la carne va disminuyendo conforme avanzan la maduración y desecación, evitando el desarrollo de algunos microorganismos y, además limitando las reacciones enzimáticas propias del proceso madurativo. Sin embargo las lipasas son enzimas que pueden permanecer activas incluso en medios de una  $a_w$  de 0,2 (Caillet y Drapon, 1974; Mutton y Bizot, 1977) a diferencia del resto de las enzimas que, en general, quedan inactivadas por debajo de  $a_w$  de 0,6 (Drapon, 1972). De ahí que en un medio de humedad intermedia, como es un embutido crudo curado, las lipasas se mantengan funcionales (Omolocho y Girard, 1983). No obstante, a medida que disminuye la  $a_w$  se va reduciendo su actividad, excepto en el caso de las lipasas del tejido adiposo, pues normalmente éstas se encuentran en su conformación óptima en medios con  $a_w$  reducida (Motilva, 1992).

Además de con el descenso de la temperatura y de la  $a_w$ , la baja actividad de la lipasa pancreática al final de la maduración podría estar relacionada con la inhibición producida por el acúmulo excesivo de los productos finales resultantes de la reacción (ácidos grasos libres). Este fenómeno, que ya se ha mencionado en apartados anteriores del presente

capítulo de resultados y discusión, también se ha descrito en otras enzimas lipolíticas como la lipasa lipoproteica del tejido muscular (Motilva, 1992) y se ha explicado de la forma siguiente: el medio adquiere una mayor rigidez al disminuir la  $a_w$ , viéndose dificultada la difusión de los ácidos grasos liberados desde la interfase hacia el exterior, con lo que aumenta su concentración en la zona de formación del complejo enzima-sustrato, dando lugar a la disminución local del agua disponible y, en consecuencia, a una inhibición reversible de la enzima (Drapon, 1972). Por otro lado, los propios ácidos grasos libres, que permanecen en la interfase son a su vez sustratos potenciales de reacciones de esterificación, compitiendo con los glicéridos por el centro activo de las enzimas (Ferreira y Patton, 1990). En este sentido no hay que olvidar que la concentración de 500 unidades de lipasa pancreática añadida al último lote de embutidos tuvo prácticamente el mismo efecto que la de 250 unidades.

### **III.7.- COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE LA FRACCION ACIDOS GRASOS LIBRES**

Una vez obtenida la fracción ácidos grasos libres (véase apartado II.3.3.7) se procedió a su análisis cualitativo y cuantitativo por cromatografía de gases de sus ésteres metílicos según se indica en dicho apartado.

Aunque se identificó un número mayor de ácidos grasos, para seguir la evolución de esta fracción sólo se tuvieron en cuenta los siete que, individualmente, se detectaron en un porcentaje superior al 1%, es decir: ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) y ácido linolénico (C18:3). También se encontraron otros ácidos grasos descritos en la bibliografía, como el ácido láurico (C12:0), el ácido araquídico (C20:0) y el ácido araquidónico (C20:4), pero en cantidades inferiores al 1%.

En los cromatogramas de todas las muestras analizadas aparecieron en mayor o menor medida tres picos extraños que, en conjunto, llegaron a

constituir en algunos casos más del 20% del área total, aunque no se tuvieron en cuenta para seguir la evolución de los fenómenos lipolíticos en los embutidos. Dos de estas sustancias eluyeron inmediatamente antes que el ácido palmítico, mientras que la tercera apareció entre los ácidos linoleico y linolénico. La presencia de estos compuestos en el análisis cromatográfico de ácidos grasos ha sido detectada también por otros autores en distintos productos cárnicos curados (Huertas, 1990). Según Salih y col. (1988) y Crackel y col. (1988) es frecuente encontrarlos al analizar los ácidos grasos, fundamentalmente de los fosfolípidos (Grigor y col., 1982; Maxwell y Marmer, 1983), en distintos productos cárnicos. En la bibliografía suelen registrarse como picos no identificados o bien como hexadecanal y octadecanal (Huertas, 1990), si bien para Salih y col. (1988) y Crackel y col. (1988) se trata realmente de sus dimetilacetales (DMAs). El hexadecanal y el octadecanal son aldehídos de cadena larga que se encuentran unidos al glicerol como éteres  $\alpha$ ,  $\beta$ - insaturados formando, junto con un ácido graso esterificado también al glicerol, los plasmalógenos (Lehninger, 1982). Estos lípidos son compuestos aldehidogénicos, ya que, una vez hidrolizados, rinden un ácido graso, glicerol, ácido fosfórico, un alcohol y el aldehído correspondiente, generalmente hexadecanal u octadecanal (Lehninger, 1982). Según los autores citados, los DMAs correspondientes se forman bajo las condiciones comunmente utilizadas en la formación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos para los análisis cromatográficos y pueden llegar a confundirse con éstos porque ambos tipos de compuestos presentan tiempos de retención muy similares cuando se analizan utilizando una fase estacionaria polar (Igene y col., 1981).

Las proporciones relativas de los principales ácidos grasos y su evolución a lo largo del proceso madurativo se recogen en las tablas III.2 (para los embutidos madurados durante 14 días) y III.3 (para los madurados durante 28 días). Como se puede observar en las tablas mencionadas, tanto al principio como al final de la maduración, el ácido graso mayoritario en todos

los lotes de embutidos fue el oleico, que en el producto final osciló entre el 33 y el 40%, seguido del linoleico (15-27%), palmítico (15-22%), esteárico (8-13%), linolénico y palmitoleico (3-6%) y mirístico (1-3%). Esta composición de la fracción de ácidos grasos libres es similar a la descrita por distintos autores (Cerise y col., 1973; Paleari Bianchi y col., 1985; Domínguez y Zumalacárregui, 1991; Beriain y col., 1993; Samelis y col., 1993; Astiasarán y col., 1993) en la mayoría de los embutidos crudos curados, si bien en el presente trabajo se detectaron cantidades de ácido linolénico mayores que las habituales. Sin embargo, los resultados obtenidos, al igual que las observaciones de los autores anteriormente citados, están en contradicción con uno de los principales estudios sobre los procesos lipolíticos en embutidos crudos curados (Demeyer y col., 1974), en el que se registra como componente mayoritario el ácido linoleico.

En cuanto a la evolución de la concentración de cada uno de los ácidos grasos, cabe señalar que el porcentaje relativo de **ácido oleico** (tablas III.2 y III.3) aumentó en los embutidos controles entre un 6,43% (los de 28 días) y un 7,95% (los de 14 días), alcanzando, por regla general, los niveles máximos en torno al décimo-decimosegundo día del proceso madurativo, tras lo que se pudo observar un descenso porcentual hasta cifras similares a las iniciales, menos evidente en los embutidos madurados durante 28 días. El descenso del porcentaje de ácido oleico observado hacia el final del proceso madurativo ha sido citado también por otros autores (Cerise y col., 1973; Paleari Bianchi y col., 1985; Astiasarán y col., 1993) Todos los embutidos elaborados con lipasa pancreática mostraron esta misma evolución en el tiempo, si bien los porcentajes iniciales sufrieron un incremento entre un 26% y un 37% según los lotes y los valores finales fueron siempre claramente superiores a los controles (entre un 10,39% más que su control en el lote 10 y un 21,74% más que su control en el lote 250).

En las figuras III.28 y III.29 se puede observar la evolución del

Tabla III.2. Composición de la fracción de ácidos grasos libres (% relativo) de los embutidos sometidos a un periodo madurativo de 14 días

Lote	Días	Acidos grasos (%)						
		C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Control	0	1,31	20,65	5,46	12,32	37,58	19,36	3,31
	2	1,76	23,99	4,05	11,48	37,75	18,79	2,17
	6	3,83	22,05	4,95	10,57	37,30	17,09	4,21
	10	1,50	21,39	3,31	10,61	40,57	20,30	2,32
	14	1,47	20,29	3,63	10,07	35,39	22,61	6,52
Lote 10	0	1,31	20,65	5,46	12,32	37,58	19,36	3,31
	2	1,16	16,58	3,95	9,51	46,34	20,33	1,13
	6	1,96	21,23	4,43	10,52	44,08	16,36	1,42
	8	1,29	21,23	3,78	13,08	43,34	13,97	3,31
	14	3,02	21,55	5,96	9,94	39,07	16,29	4,17
Lote 30	0	1,31	20,65	5,46	12,32	37,58	19,36	3,31
	2	4,50	26,41	5,28	14,19	32,51	13,28	2,83
	6	4,10	23,22	3,91	12,66	39,82	12,92	3,37
	8	2,42	21,69	4,53	9,92	45,11	13,20	3,13
	14	2,19	22,48	3,81	8,11	40,49	17,74	5,23
Lote 40	0	1,31	20,65	5,46	12,32	37,58	19,36	3,31
	2	1,55	22,84	3,58	9,66	40,90	18,09	3,37
	6	1,63	23,08	3,94	10,24	41,87	16,53	2,71
	10	1,23	17,83	4,15	9,22	47,35	16,97	3,26
	14	2,15	21,63	3,98	10,63	39,91	17,41	4,28
Lote 60	0	1,31	20,65	5,46	12,32	37,58	19,36	3,31
	2	3,80	21,99	4,56	10,50	38,45	16,73	3,97
	6	4,75	23,02	6,31	12,65	34,20	14,95	4,11
	10	2,29	20,34	4,58	11,96	38,17	17,85	4,81
	14	2,60	19,46	4,21	11,02	39,72	17,83	5,16

Tabla III.3. Composición de la fracción de ácidos grasos libres (% relativo) de los embutidos sometidos a un periodo madurativo de 28 días

Lote	Días	Acidos grasos (%)						
		C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Control	0	1,17	19,21	4,74	11,28	32,87	27,27	3,54
	2	2,60	20,29	4,39	8,92	30,46	27,73	5,61
	6	3,63	17,53	6,28	8,33	30,86	26,96	6,40
	12	2,77	18,42	5,32	8,63	33,42	26,04	5,38
	19	1,86	18,81	4,57	9,81	34,89	24,97	5,10
	28	1,63	18,84	3,70	11,85	33,25	25,47	5,26
Lote 3	0	1,17	19,21	4,74	11,28	32,78	27,27	3,54
	2	3,03	21,08	5,01	10,34	34,03	20,01	5,55
	6	4,14	17,01	6,01	8,57	32,46	24,80	6,67
	12	0,98	15,69	2,94	8,23	42,28	26,77	3,10
	19	0,97	15,18	3,49	7,74	42,26	27,94	2,42
	28	1,05	17,05	3,53	8,37	38,13	27,43	3,55
Lote 90	0	1,17	19,21	4,74	11,28	32,78	27,27	3,54
	2	1,50	14,00	3,67	8,70	41,51	26,06	4,56
	6	2,82	16,91	4,90	10,11	41,72	19,48	4,07
	12	1,50	17,12	4,34	9,57	42,22	21,19	4,05
	19	3,26	14,73	3,51	11,19	38,73	21,83	6,75
	28	2,38	19,87	4,51	9,58	37,32	19,90	6,44
Lote 180	0	1,17	19,21	4,74	11,28	32,78	27,27	3,54
	2	2,98	20,72	4,81	14,54	29,70	21,86	5,38
	6	1,85	14,92	4,80	11,06	41,98	20,23	5,16
	12	1,25	17,23	3,67	10,85	41,34	19,42	6,24
	19	2,79	23,46	2,74	13,49	33,12	16,72	6,68
	28	2,26	21,51	3,31	10,99	39,53	17,66	4,74
Lote 250	0	1,17	19,21	4,74	11,28	32,78	27,27	3,54
	2	2,38	14,69	4,79	10,53	43,08	19,70	4,81
	6	2,13	18,76	4,53	10,44	44,87	15,55	3,72
	14	2,30	17,65	5,30	10,96	43,10	16,60	4,08
	28	2,62	15,64	6,60	12,39	40,48	16,17	6,49
	Lote 500	0	1,17	19,21	4,74	11,28	32,78	27,27
2		1,82	17,94	4,36	9,98	42,96	19,50	3,42
6		3,73	16,73	5,84	10,93	39,24	19,48	4,40
14		2,35	23,73	6,15	8,45	41,83	14,31	3,18
28		3,23	16,08	6,20	10,95	40,18	17,96	5,38

contenido de ácido oleico en términos de mg/100 g E.S. en los distintos lotes experimentales. Si se comparan las gráficas de estas figuras con la del glicérido parcial que se acumuló en mayor cuantía, es decir, la fracción diglicéridos (Fig. III.18 y III.19), se puede observar que ambos modelos de evolución fueron similares, lo que indica que durante la maduración de los embutidos experimentales se produjo la hidrólisis de triglicéridos y la acumulación de diglicéridos y la correspondiente liberación de ácidos grasos, en el presente caso el ácido oleico, el mayoritario. Igualmente se observó, como en el caso de los diglicéridos, que el incremento de este ácido graso fue, en términos generales, gradual a lo largo de todo el proceso en los lotes de embutidos a los que se añadió menos cantidad de lipasa pancreática (lotes 3, 10, 30, 40 y 60), pero en los elaborados con las mayores cantidades de enzima (lotes 90, 180, 250 y 500), el mayor incremento de ácido oleico tuvo lugar durante las primeras 48 horas de maduración. Se pueden establecer similares consideraciones si se compara la evolución del contenido de ácido oleico con la fracción ácidos grasos libres totales, tanto en términos de extracto seco (Fig. III.24 y III.25) como expresada en porcentaje de materia grasa (Fig. III.26 y III.27). Realmente no se podía esperar un comportamiento distinto, ya que las concentraciones relativas de ácido oleico en cada uno de los lotes a lo largo de todo el periodo madurativo, fueron, aunque con algunas fluctuaciones, bastante regulares (tablas III.2 y III.3).

El **ácido linoleico** presentó cantidades iniciales variables en los distintos lotes, con cifras del 19,36% (tabla III.2) y el 27,27% (tabla III.3) y su evolución en los controles también fue irregular. En los embutidos madurados durante 14 días experimentó un aumento del 16,78%, mientras que en los de 28 días de maduración se observó un ligero descenso, del 6,60%. Excepto en los salchichones elaborados con la menor cantidad de lipasa (lote 3), cuya evolución fue similar a sus controles, en el resto se observó un descenso progresivo del contenido de este ácido graso, tanto más importante cuanto mayor era la cantidad de enzima añadida. En el lote 250 este descenso llegó al

41%. Este fenómeno podría estar relacionado con la opinión de Forss (1972), que señala que el ácido linoleico es uno de los primeros sustratos de la oxidación y, por lo tanto, es lógico que se detecte menos cantidad de este ácido graso en los embutidos a medida que avanza la maduración. No obstante, la evolución de la concentración de ácido linoleico descrita en la bibliografía es contradictoria. Algunos autores registran un aumento de este ácido graso a lo largo del periodo madurativo (Demeyer y col., 1974, Domínguez y Zumalacárregi, 1991; Samelis y col., 1993), mientras que otros (Bianchi y col., 1985; Melgar y col., 1989; Astiasarán y col., 1993) citan un descenso a partir de la fase fermentativa hasta el final del proceso. Astiasarán y col. (1993), comparando distintos métodos de fabricación de chorizo observaron además que este descenso se producía en mayor grado en los embutidos con un elevado índice de lipólisis.

En las figuras III.30 y III.31 se muestra la evolución del contenido de ácido linoleico en todos los lotes de embutidos a lo largo de la maduración en términos de extracto seco. El perfil de las gráficas es similar al observado en el caso del ácido oleico, por lo que, en principio, son válidas las mismas consideraciones. Sin embargo hay un detalle que merece la pena destacar y que se observó claramente en los embutidos que contenían mayores cantidades de lipasa (lotes 90, 180, 250 y 500). Si se compara la figura III.29 (evolución del contenido de ácido oleico en dichos lotes) con la III.31 (evolución del contenido de ácido linoleico en los mismos lotes), se puede observar la misma tendencia en ambos ácidos grasos, pero las diferencias absolutas de los lotes con lipasa en relación con los embutidos controles fueron mayores en el caso del ácido oleico. Así, tomando los valores registrados a partir de la segunda semana de maduración en dichos lotes 90, 180, 250 y 500 se puede llegar en cada caso a una relación "contenido de ácido oleico del lote elaborado con lipasa/contenido de ácido oleico del lote control" próxima a 5-6 mientras que la misma relación para el caso del ácido linoleico es de alrededor de 3. En principio esta relación debería ser similar en ambos casos, si se asume que la

lipólisis afecta por igual a los dos ácidos grasos, al encontrarse en su mayor parte esterificados en la misma posición (sn3) del glicerol (Brockhoff, 1966). La menor relación observada en el caso del ácido linoleico parece indicar la existencia de una degradación de este ácido graso, hecho que ya se ha comentado anteriormente en relación con el descenso progresivo del mismo que se observó a partir de los datos derivados del cromatograma (tabla III.3).

El **ácido palmítico** apenas experimentó variaciones en sus porcentajes a lo largo del proceso en los embutidos controles, manteniéndose siempre en torno a las cifras iniciales del 19-20%. En cuanto a su comportamiento en los embutidos elaborados con lipasa pancreática, se observó una evolución irregular. En la mayoría de los lotes (del 3 al 180), la concentración de este ácido graso se mantuvo en valores similares durante todo el proceso madurativo, mientras que en los lotes 250 y 500 se observó un descenso respecto a su contenido inicial del 18,58% y 16,29% respectivamente. El aumento de la concentración de ácido oleico y el descenso de la de ácido palmítico coincide con los resultados de Debevere y col., (1976), que señalan también dicho comportamiento a medida que aumenta el tiempo de actuación de los enzimas lipolíticos sobre la grasa. Las figuras III.32 y III.33 muestran su evolución en mg/100 g E.S. y en ellas se puede observar que las gráficas obtenidas fueron, en términos generales, similares a las del ácido oleico, por lo que el análisis realizado para dicho ácido graso es extensible al ácido palmítico.

Los porcentajes relativos de **ácido esteárico** que se obtuvieron en los embutidos controles (tablas III.2 y III.3) no permitieron establecer un patrón de su evolución a lo largo del proceso madurativo. Así, en los lotes de 28 días de maduración, su contenido se estabilizó en cifras finales próximas a las iniciales, es decir, del orden de un 11%, mientras que en los de 14 días disminuyó un 18,26%, desde un 12,32% inicial hasta un 10,07% final. Este comportamiento irregular ha sido observado también por otros autores (Astiasarán y col., 1993). En cuanto a los salchichones elaborados con lipasa se

observó una tendencia decreciente de hasta el 34% en el lote 30, menos marcada a medida que se incrementaba la cantidad de enzima añadida y cercana a la estabilización en los lotes 180, 250 y 500. En definitiva, tampoco en este caso se observó un modelo definido de comportamiento. Las figuras III.34 y III.35 muestran la evolución del contenido de este ácido graso en mg/100 g E.S. en los lotes de embutidos madurados durante 14 y 28 días, respectivamente. El perfil de las gráficas es semejante al de los ácidos grasos analizados anteriormente.

El **ácido linolénico** fue, quizás, el que mostró un comportamiento más regular durante la maduración. Se detectó en la masa preparada para embutir en cantidades algo superiores al 3% (tablas III.2 y III.3) y a lo largo de ambos periodos madurativos sufrió un aumento en todos los embutidos, tanto en los controles como en los elaborados con lipasa, hasta valores finales entre el 4 y el 6%. Estas cifras son superiores al 1-2% registrado normalmente en los distintos trabajos sobre embutidos crudos curados (Palaia Bianchi y col., 1985; Melgar y col., 1990; Domínguez y Zumalacárregui, 1991; Astiasarán y col., 1993). En las figuras III.36 y III.37 se observa su evolución en mg/100 g E.S. El aumento progresivo del porcentaje relativo de este ácido graso durante la maduración no se reflejó en gráficas con un perfil diferente del de los ácidos grasos anteriormente discutidos, sin duda debido al carácter minoritario del ácido linolénico.

El **ácido palmitoleico** disminuyó un 21,94% en los controles de 28 días (tabla III.3) y un 33,51% en los de 14 días (tabla III.2). Esta evolución es similar a la observada en todos los trabajos citados anteriormente (Palaia Bianchi y col., 1985; Melgar y col., 1990; Astiasarán y col., 1993)). En el caso de los embutidos con lipasa esta tendencia decreciente fue siendo menor a medida que se aumentaba la cantidad de enzima añadida, observándose incluso un incremento en los lotes 250 y 500 hasta cifras finales superiores al 6%. No obstante, los resultados obtenidos no permiten extraer conclusiones definitivas.

Los cambios del contenido absoluto de este ácido graso (mg/100 g E.S.) en los distintos lotes se reflejan en las figuras III.38 y III.39., en las que nuevamente el modelo de gráfica se ajusta al observado en el caso de los demás ácidos grasos.

El porcentaje de **ácido mirístico** aumentó en los controles, desde valores cercanos al 1% hasta aproximadamente un 3% en el sexto día de maduración, para luego volver a los niveles iniciales al final del proceso (tablas III.2 y III.3). Esta evolución y los valores registrados son los citados normalmente para este ácido graso (Palaia Bianchi y col. 1985; Domínguez y Zumalacárregui, 1991). En los embutidos fabricados con lipasa se observó una evolución más irregular, en algunos constantemente ascendente, mientras que en otros fue parecida a los controles. No obstante, en todos los lotes elaborados con enzima los valores finales fueron ligeramente superiores a los determinados en los controles. En las figuras III.40 y III.41 se puede apreciar su evolución en mg/100 g E.S., que, una vez más, se ajustó al perfil observado en el resto de los ácidos grasos analizados.

A la vista de los resultados obtenidos y como diferencias respecto al comportamiento de los controles, se puede decir que, a nivel porcentual (ácido graso/total de ácidos grasos libres) la adición de lipasa a los embutidos determinó:

- una mayor liberación de ácido oleico y ácido mirístico.
- una reducción del contenido de ácido linoleico.
- un aumento de la cantidad de ácido palmítico.
- una disminución del contenido de los ácidos esteárico y palmitoleico.

No obstante, como en la mayoría de los casos los resultados no mostraron una evolución clara, en líneas generales sólo se puede hablar de tendencias.

En el capítulo de introducción ya se ha señalado que los triglicéridos de la grasa de cerdo muestran una distribución particular de los ácidos grasos y, así, la mayor parte del ácido esteárico (alrededor del 60%) se presenta esterificado en la posición sn1, el palmítico (60-80%) en la posición 2 y los ácidos octadecenoicos (50-60%) en la posición sn3 de la molécula (Brockerhoff, 1966). Puesto que la lipasa pancreática, al igual que las lipasas microbianas, ataca específicamente las posiciones sn1 y sn3 (Alford y col., 1971; Whitaker, 1972), el mayor grado de lipólisis debería observarse en los ácidos de 18 átomos de carbono: esteárico y oleico, linoleico y linolénico (Demeyer y col., 1974; Naes y col., 1992). En el presente trabajo, y parcialmente de acuerdo con estos autores, la adición de lipasa pancreática tuvo incidencia principalmente sobre la liberación de C18:0 y C18:1, aunque también sobre el C14:0. Sin embargo, no se observó la liberación mayoritaria de ácido linoleico citada por Demeyer y col., (1974) y más recientemente por Samelis y col. (1993), ni siquiera en los embutidos controles, en los que la actividad lipolítica recae sólo en las lipasas endógenas y de origen microbiano. Por el contrario, se registró un descenso porcentual de este ácido graso a lo largo del proceso madurativo, más acentuado con la incorporación de lipasa a los embutidos.

Así pues, según los resultados obtenidos en los salchichones experimentales, la lipasa pancreática pareció mostrar una mayor especificidad por la posición sn3 de los triglicéridos, pero, aunque en ella se encuentran esterificados tanto el ácido oleico como el linoleico, la actividad hidrolítica se centró fundamentalmente en el oleico y apenas se manifestó en el caso del ácido linoleico. Dado que ambos ácidos grasos difieren muy poco en cuanto a su peso molecular, la acumulación de ácido oleico libre podría deberse a la especificidad estructural que presenta la lipasa pancreática (Whitaker, 1972; Kilara, 1985), sin olvidar tampoco que el ácido linoleico es el principal sustrato de la oxidación lipídica (Fors, 1972), especialmente cuando se halla en forma libre, de modo que aunque se libere en grandes cantidades, puede que

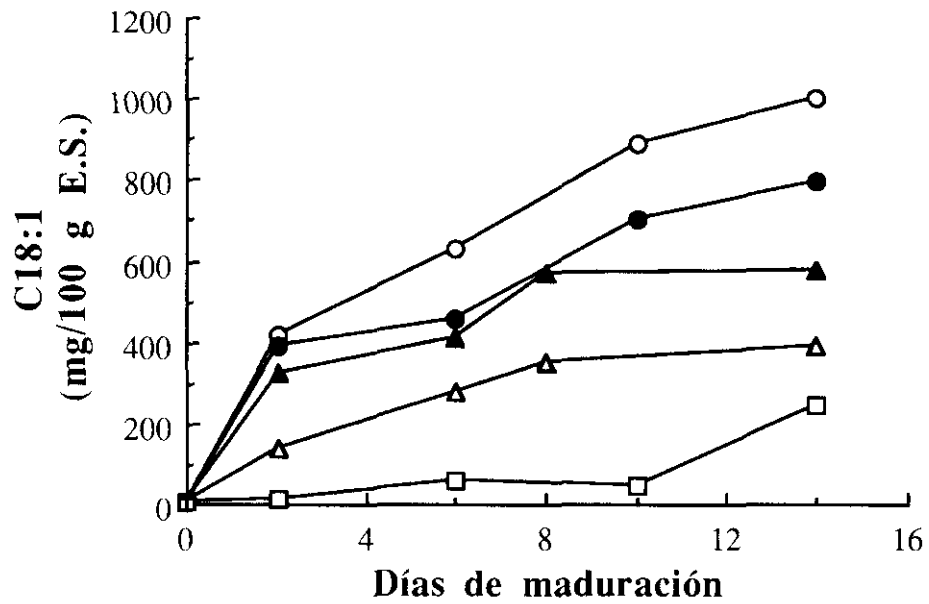


Figura III.28.- Evolución del contenido de ácido oleico (mg/100 g E.S.) de los lotes de embutidos madurados durante 14 días: (□) Control; (△) Lote 10; (▲) Lote 30; (○) Lote 40; (●) Lote 60.

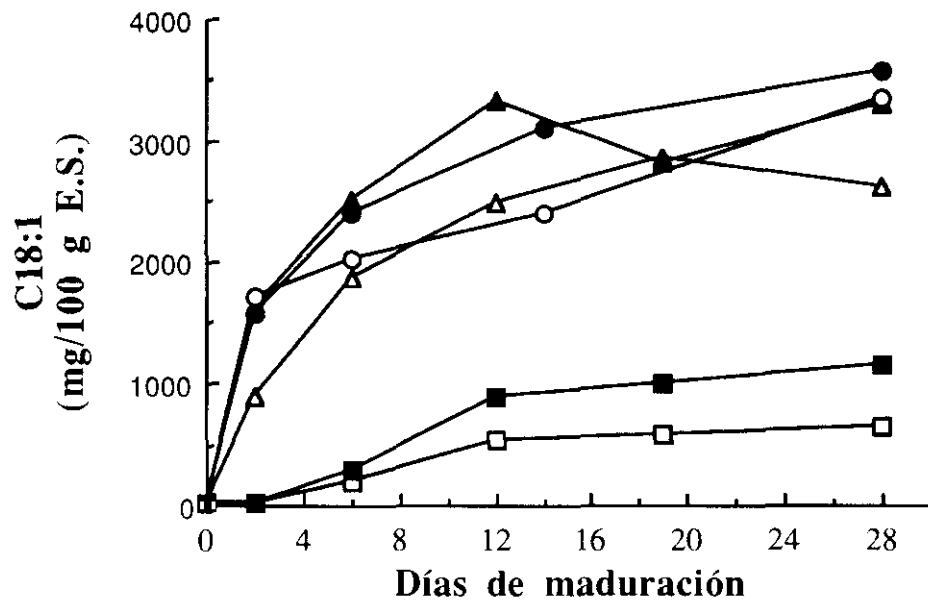


Figura III.29.- Evolución del contenido de ácido oleico (mg/100 g E.S.) de los lotes de embutidos madurados durante 28 días: (□) Control; (■) Lote 3; (△) Lote 90; (▲) Lote 180; (○) Lote 250; (●) Lote 500.

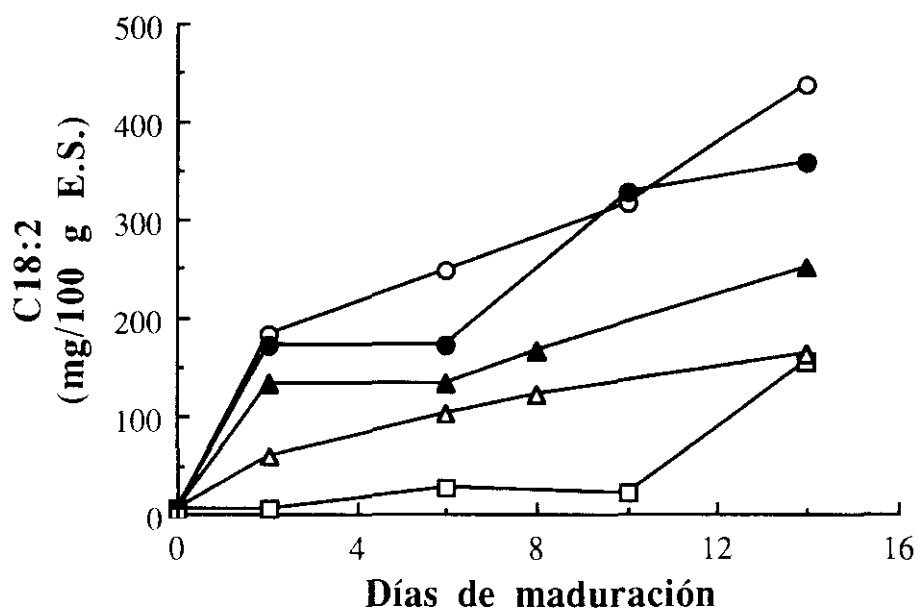


Figura III.30.- Evolución del contenido de ácido linoleico (mg/100 g E.S.) de los lotes de embutidos madurados durante 14 días: (□) Control; (△) Lote 10; (▲) Lote 30; (○) Lote 40; (●) Lote 60.

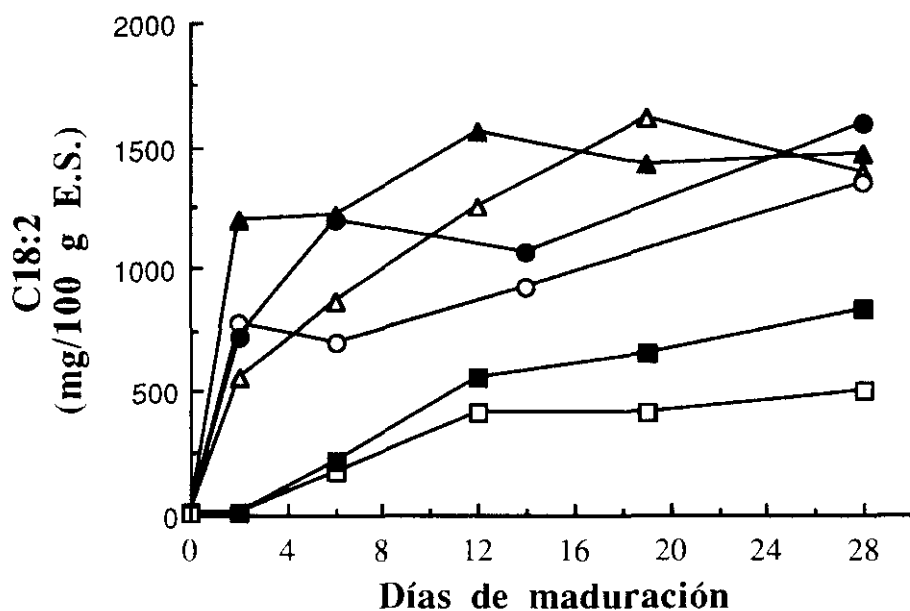


Figura III.31.- Evolución del contenido de ácido linoleico (mg/100 g E.S.) de los lotes de embutidos madurados durante 28 días: (□) Control; (■) Lote 3; (△) Lote 90; (▲) Lote 180; (○) Lote 250; (●) Lote 500.

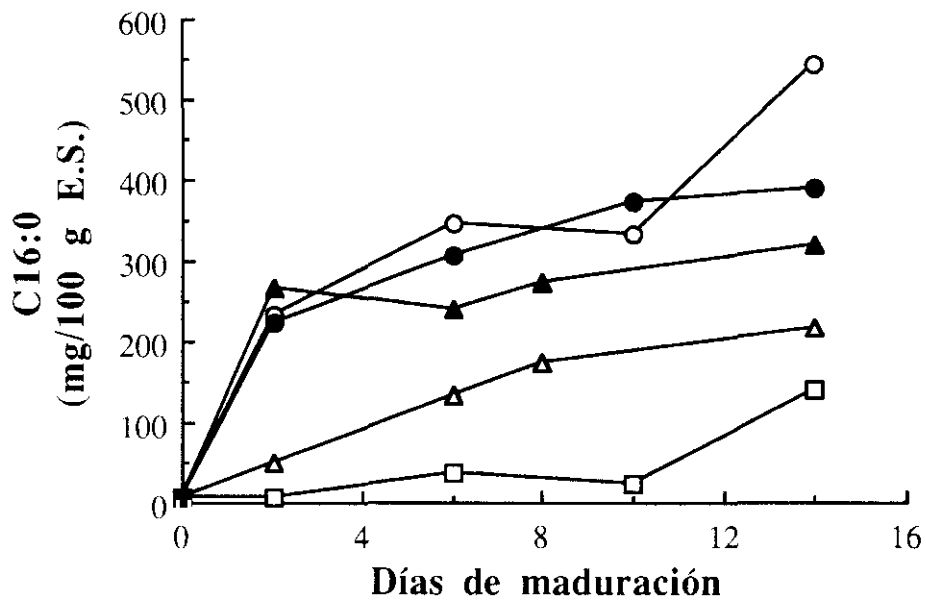


Figura III.32.- Evolución del contenido de ácido palmítico (mg/100 g E.S.) de los lotes de embutidos madurados durante 14 días: (□) Control; (△) Lote 10; (▲) Lote 30; (○) Lote 40; (●) Lote 60.

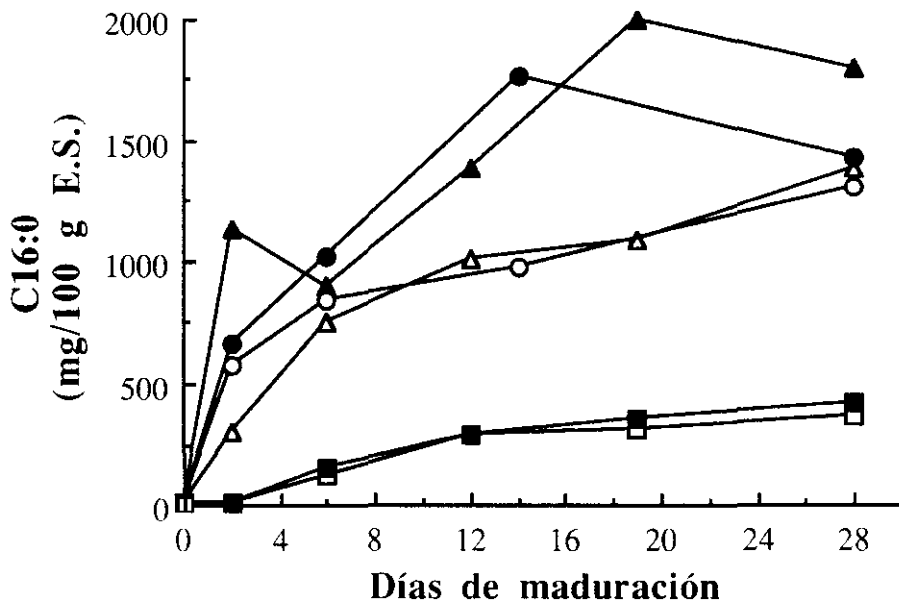
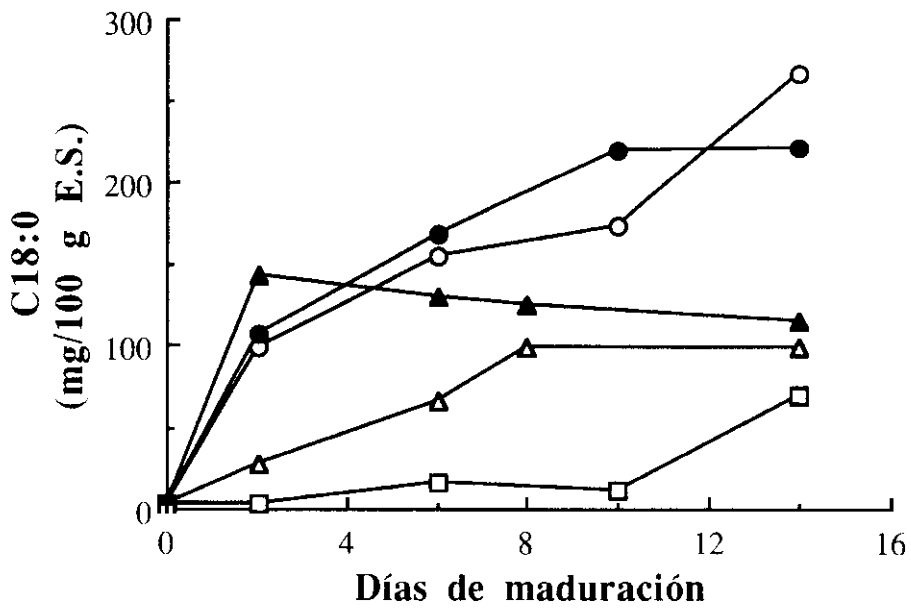
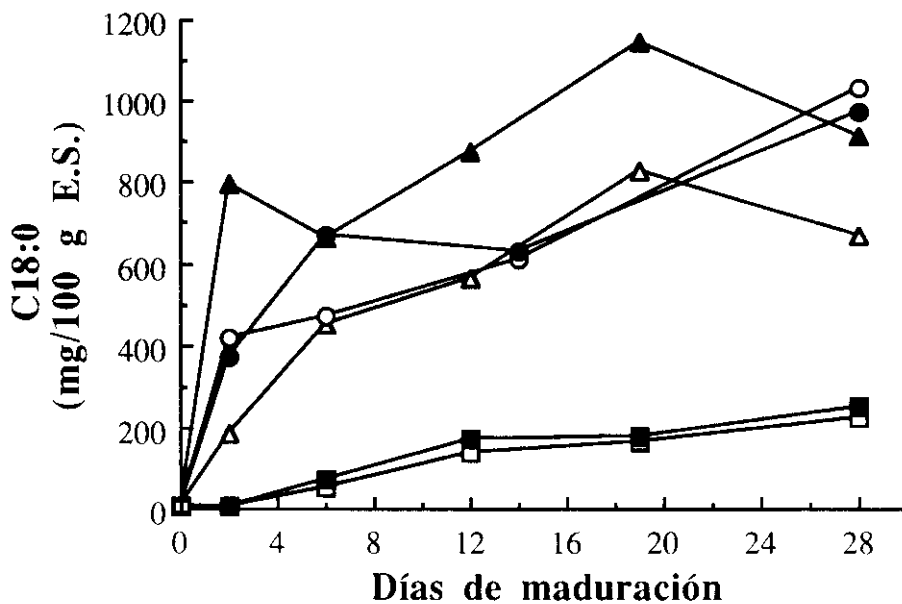


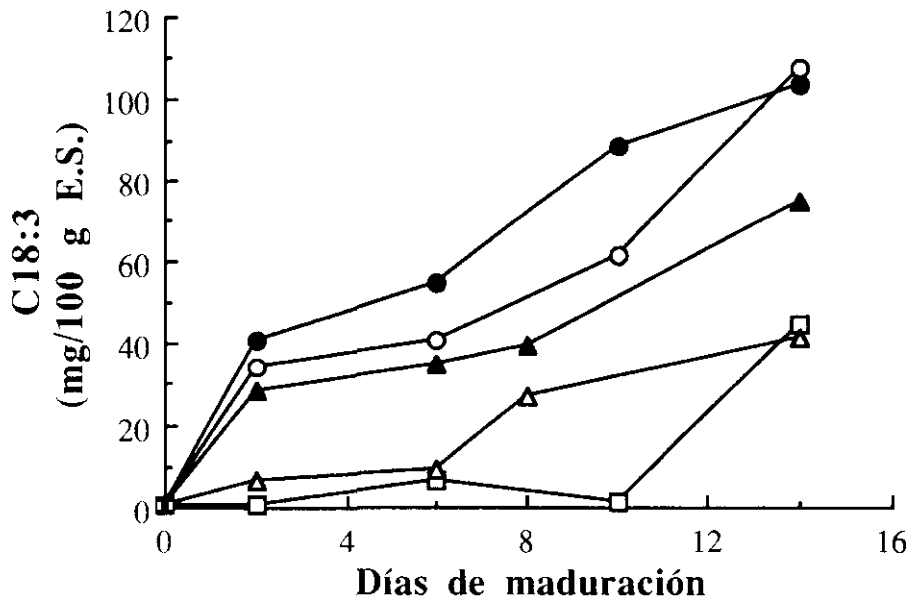
Figura III.33.- Evolución del contenido de ácido palmítico (mg/100 g E.S.) de los lotes de embutidos madurados durante 28 días: (□) Control; (■) Lote 3; (△) Lote 90; (▲) Lote 180; (○) Lote 250; (●) Lote 500.



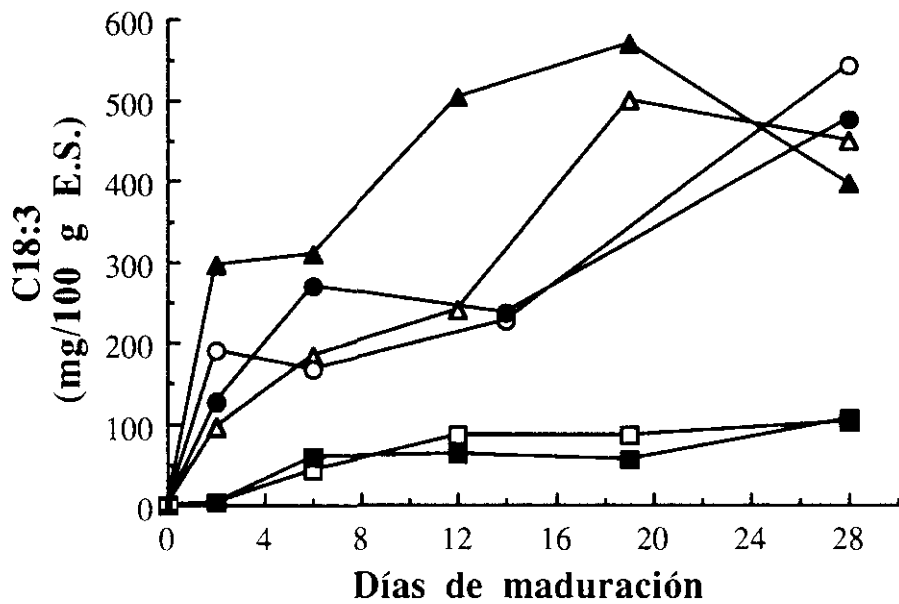
**Figura III.34.-** Evolución del contenido de ácido esteárico (mg/100 g E.S.) de los lotes de embutidos madurados durante 14 días: (□) Control; (△) Lote 10; (▲) Lote 30; (○) Lote 40; (●) Lote 60.



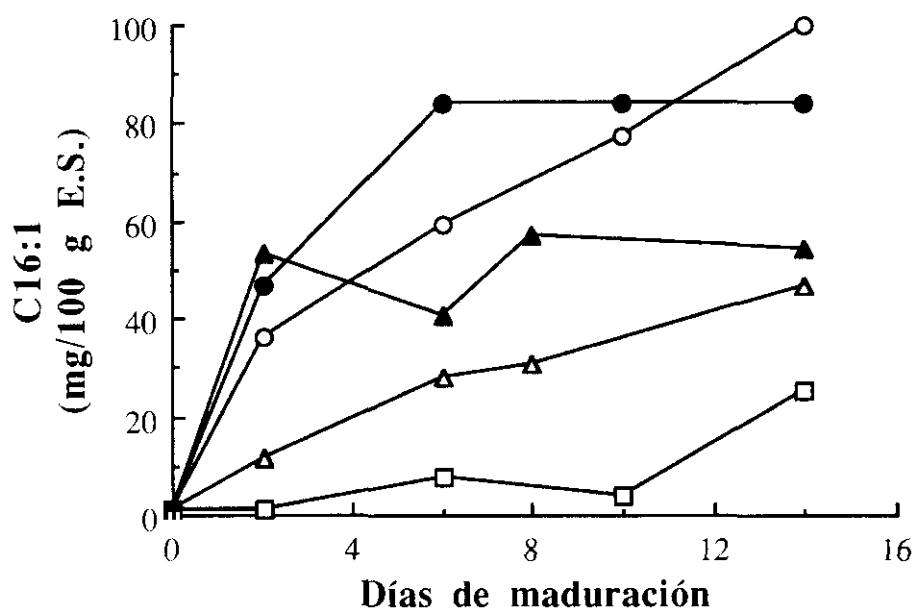
**Figura III.35.-** Evolución del contenido de ácido esteárico (mg/100 g E.S.) de los lotes de embutidos madurados durante 28 días: (□) Control; (■) Lote 3; (△) Lote 90; (▲) Lote 180; (○) Lote 250; (●) Lote 500.



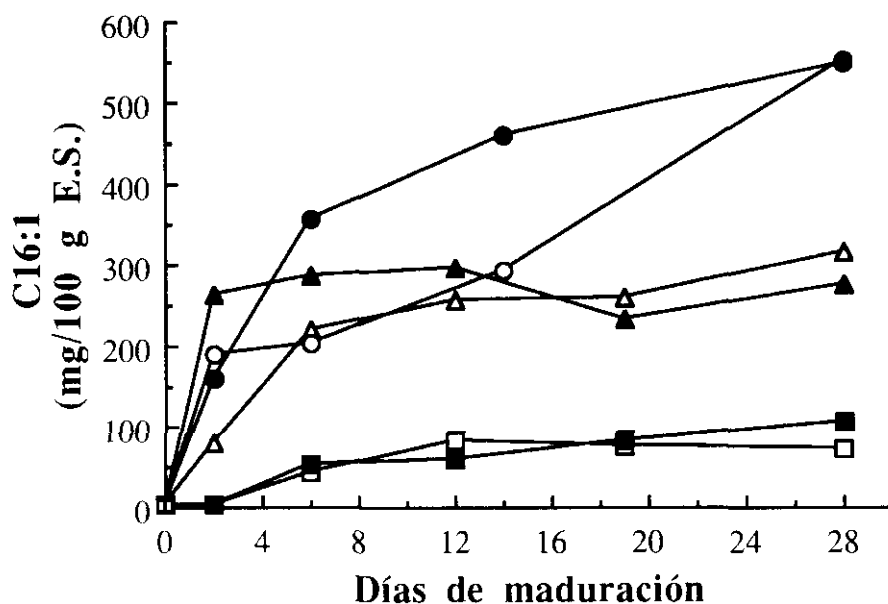
**Figura III.36.-** Evolución del contenido de ácido linolénico (mg/100 g E.S.) de los lotes de embutidos madurados durante 14 días: (□) Control; (△) Lote 10; (▲) Lote 30; (○) Lote 40; (●) Lote 60.



**Figura III.37.-** Evolución del contenido de ácido linolénico (mg/100 g E.S.) de los lotes de embutidos madurados durante 28 días: (□) Control; (■) Lote 3; (△) Lote 90; (▲) Lote 180; (○) Lote 250; (●) Lote 500.



**Figura III.38.-** Evolución del contenido de ácido palmitoleico (mg/100 g E.S.) de los lotes de embutidos madurados durante 14 días: (□) Control; (△) Lote 10; (▲) Lote 30; (○) Lote 40; (●) Lote 60.



**Figura III.39.-** Evolución del contenido de ácido palmitoleico (mg/100 g E.S.) de los lotes de embutidos madurados durante 28 días: (□) Control; (■) Lote 3; (△) Lote 90; (▲) Lote 180; (○) Lote 250; (●) Lote 500.

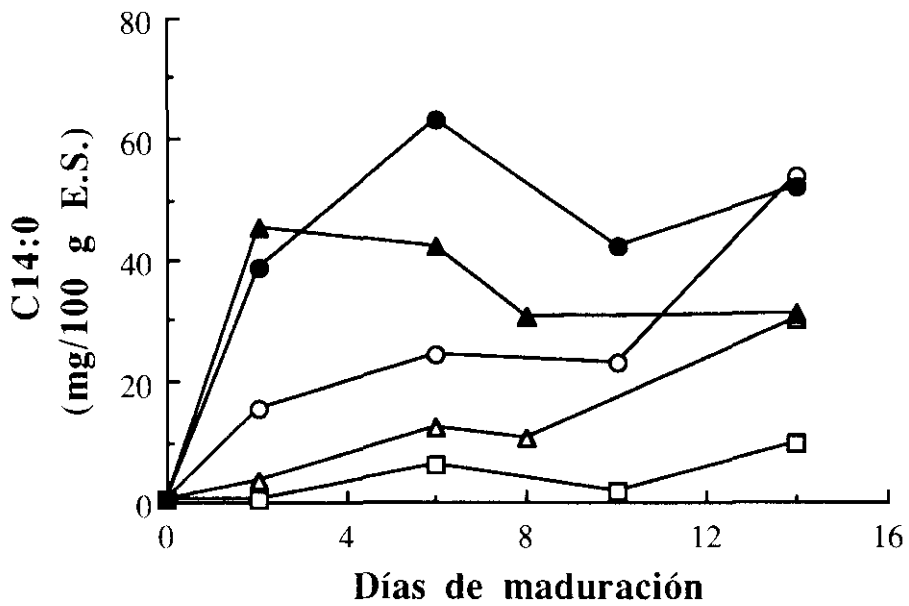


Figura III.40.- Evolución del contenido de ácido mirístico (mg/100 g E.S.) de los lotes de embutidos madurados durante 14 días: ( □ ) Control; ( △ ) Lote 10; ( ▲ ) Lote 30; ( ○ ) Lote 40; ( ● ) Lote 60.

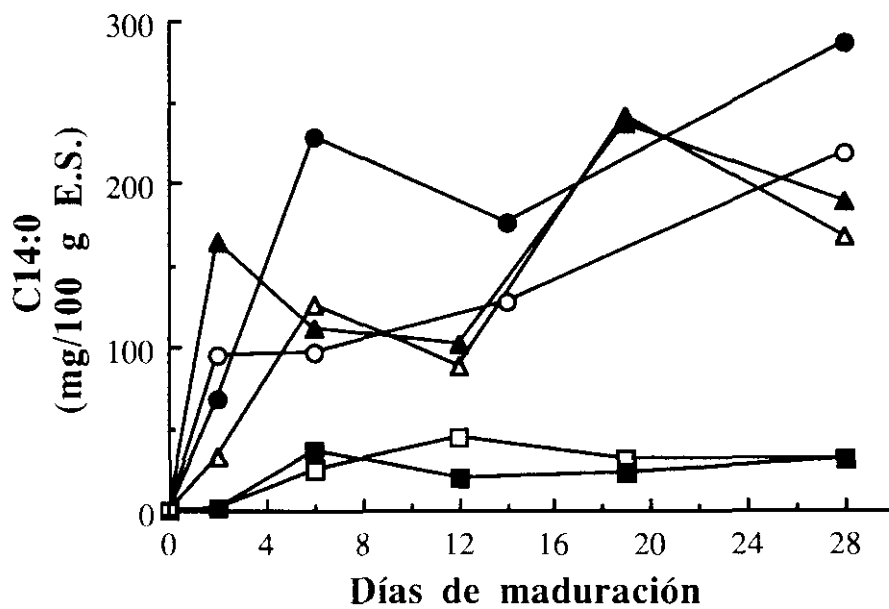


Figura III.41.- Evolución del contenido de ácido mirístico (mg/100 g E.S.) de los lotes de embutidos madurados durante 28 días: ( □ ) Control; ( ■ ) Lote 3; ( △ ) Lote 90; ( ▲ ) Lote 180; ( ○ ) Lote 250; ( ● ) Lote 500.

simultáneamente recaigan sobre el los fenómenos oxidativos y, por lo tanto, no se detecte su acumulación.

Como consecuencia de la mencionada actividad hidrolítica específica de las lipasas microbianas y la lipasa pancreática, y al igual que observaron anteriormente Lizárraga y col. (1989), durante el proceso de curado de los embutidos se observaron variaciones en la relación saturación/insaturación de los ácidos de 16 y 18 átomos de carbono, lo que condujo a una serie de diferencias en el cociente global saturación/insaturación. En las tablas III.4 y III.5 se pueden apreciar los cambios producidos en dicho cociente en los distintos lotes de embutidos durante la maduración. Los valores observados en el presente trabajo son similares a los obtenidos por otros autores (Chasco y col., 1993) en diferentes embutidos (chorizo, salchichón y salami), tanto los referidos al cociente C16:0/C16:1 como a la relación C18:0/C18:1+2+3. Sin embargo, el mismo equipo de investigadores (Melgar y col., 1990) han señalado cifras unas 3-4 veces superiores en salami para ambos índices.

El análisis global de las tablas III.4 y III.5 permite decir que, tanto en los embutidos controles como en los que contenían lipasa pancreática los citados índices de saturación/insaturación no variaron de forma importante durante el proceso madurativo. La relación C16:0/C16:1 osciló, en términos generales, entre valores mínimos de 3,616 y máximos de 6,462, aunque ocasionalmente se registró alguna cifra superior, como la correspondiente al decimonoveno día de maduración del lote 180 (8,562). El cociente C18:0/C18:1+2+3 estuvo comprendido entre 0,130 y 0,292 y el cociente global saturados/insaturados osciló entre 0,329 y 0,759. Así pues, no se puede deducir ningún efecto manifiesto en relación con el grado de insaturación de la fracción ácidos grasos libres de los embutidos experimentales ni como consecuencia de un proceso madurativo convencional ni por la adición de lipasa pancreática. Las tendencias crecientes o decrecientes que se observaron, aunque de forma no muy concluyente, en algunos ácidos grasos (tablas III.2 y

III.3) no se reflejaron en el nivel de saturación/insaturación. Es posible que el aumento de algunos ácidos grasos, por ejemplo el ácido oleico (que debería lógicamente aumentar el grado de insaturación), se compense en cada caso con el aumento paralelo de algún ácido graso saturado o, alternativamente, con la disminución de otro con un mayor número de dobles enlaces que el oleico (por haberse liberado en menor cuantía o por haber sufrido procesos oxidativos) o con la combinación de ambos fenómenos.

Chasco y col. (1993) indican que durante la fase fermentativa se produce un aumento del grado de insaturación de la fracción ácidos grasos libres y que posteriormente este fenómeno se invierte. Estos autores obtienen estas conclusiones a partir de valores del índice C16:0/C16:1 que pasan de 4,738 en la masa inicial a 4,570 tras la fermentación en el caso del chorizo y de 4,605 a 4,532 en el caso del salchichón, obteniendo al final de la maduración cifras de 5,247 y 5,115 respectivamente. Igualmente, Chasco y col. (1993) deducen consideraciones similares de la evolución del cociente C18:0/C18:1+2+3, con valores que oscilan entre 0,26 y 0,14. En opinión de la autora del presente trabajo, estas variaciones no son tan importantes como para llegar a dichas conclusiones. No obstante, en el trabajo de Melgar y col. (1990) sí que se puede deducir un aumento claro del grado de insaturación durante todo el proceso madurativo, ya que, partiendo de valores de alrededor de 15, el índice C16:0/C16:1 pasa a 7,3 en el producto acabado y el C18:0/C18:1+2+3 pasa de 0,5 inicial a 0,24 final. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo, tanto en los embutidos controles como en los lotes que contenían lipasa pancreática concuerdan con las observaciones de Chasco y col. (1993), pero no con las de Melgar y col. (1990).

### **III.8.- COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE LA FRACCION ACIDOS GRASOS DE CADENA CORTA**

La obtención de esta fracción, así como la identificación y cuantificación

Tabla III.4. Relación de ácidos grasos libres saturados/insaturados en los embutidos sometidos a un periodo madurativo de 14 días

Lote	Días	Acidos grasos		
		C16:0/C16:1	C18:0/C18:1+2+3	Saturados/ Insaturados
Control	0	3,782	0,204	0,569
	2	5,923	0,196	0,634
	6	4,455	0,180	0,622
	10	6,462	0,168	0,530
	14	5,590	0,156	0,493
Lote 10	0	3,782	0,204	0,569
	2	4,197	0,140	0,402
	6	4,792	0,170	0,545
	8	5,616	0,216	0,587
	14	3,616	0,167	0,580
Lote 30	0	3,782	0,204	0,569
	2	5,002	0,292	0,928
	6	5,939	0,226	0,713
	8	4,788	0,161	0,554
	14	5,900	0,128	0,517
Lote 40	0	3,782	0,240	0,569
	2	6,380	0,155	0,546
	6	5,858	0,168	0,572
	10	4,296	0,136	0,418
	14	5,435	0,173	0,559
Lote 60	0	3,782	0,204	0,569
	2	4,822	0,178	0,614
	6	3,648	0,238	0,759
	10	4,441	0,197	0,569
	14	4,622	0,176	0,528

Tabla III.5. Relación de ácidos grasos libres saturados/insaturados en los embutidos sometidos a un periodo madurativo de 28 días

Lote	Días	Acidos grasos		
		C16:0/C16:1	C18:0/C18:1+2+3	Saturados/ Insaturados
Control	0	4,053	0,177	0,498
	2	4,622	0,140	0,499
	6	2,791	0,130	0,459
	12	3,462	0,133	0,460
	19	4,116	0,151	0,469
	28	5,092	0,185	0,505
Lote 3	0	4,053	0,177	0,498
	2	4,208	0,174	0,578
	6	2,830	0,134	0,465
	12	5,337	0,114	0,345
	19	4,350	0,107	0,329
	28	4,830	0,121	0,383
Lote 90	0	4,053	0,177	0,498
	2	3,815	0,121	0,336
	6	3,451	0,155	0,457
	12	3,945	0,142	0,418
	19	4,197	0,166	0,434
	28	4,406	0,150	0,500
Lote 180	0	4,053	0,177	0,498
	2	4,308	0,255	0,672
	6	3,108	0,164	0,413
	12	4,695	0,162	0,438
	19	8,562	0,239	0,703
	28	6,498	0,196	0,561
Lote 250	0	4,053	0,177	0,498
	2	3,067	0,156	0,408
	6	4,141	0,163	0,488
	14	3,330	0,172	0,485
	28	2,370	0,196	0,485
Lote 500	0	4,053	0,177	0,498
	2	4,115	0,151	0,451
	6	2,865	0,173	0,497
	14	3,859	0,142	0,582
	28	2,594	0,172	0,476

de sus componentes se llevó a cabo siguiendo el método de Dainty y Hibbard (1980) descrito previamente en el apartado II.3.3.8.

Normalmente los ácidos grasos de cadena corta no forman parte (o al menos no en cantidades significativas) de la composición de los mono, di y triglicéridos de la carne y la grasa, por lo que su presencia en los embutidos se debe en general a procesos degradativos de distintos compuestos llevados a cabo por los microorganismos. Así por ejemplo, en la carne refrigerada, el ácido acético deriva en gran medida de la fermentación de los carbohidratos (Dainty y col., 1979; Kandler, 1983), mientras que los ácidos iso-butírico e iso-valérico proceden de las transformaciones microbianas de los aminoácidos valina y leucina respectivamente (Dainty y Hibbard, 1983). Otros, como el ácido propiónico y el ácido n-butírico parecen no estar relacionados con la actividad microbiana sino con actividades enzimáticas intrínsecas de la carne (Dainty y col., 1979). En los productos cárnicos madurados estas sustancias pueden tener también un origen microbiano, pero, además, pueden derivar de la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga, principalmente de los poliinsaturados (Dainty y Hibbard, 1980; Ordóñez y col., 1989; Berdagué y col., 1993). En definitiva, la actividad de las lipasas tanto microbianas, como las propias de la carne y, en el presente caso, la lipasa pancreática, tendría gran trascendencia, bien como consecuencia de la liberación de ácidos grasos de cadena larga, a partir de los que se formarían ácidos grasos de cadena corta por la vía de la autooxidación o bien como causa directa de su liberación a partir de los lípidos. Hay que recordar que aunque no sean mayoritarios en la carne, la lipasa pancreática presenta una mayor actividad frente a triglicéridos esterificados con ácidos grasos de cadena corta que de cadena larga, presentando la máxima intensidad con la tripropionina y la tributirina (Whitaker, 1972).

Los ácidos grasos analizados fueron acético (C2:0), propiónico (C3:0), iso-butírico (isoC4:0), n-butírico (C4:0), iso-valérico (isoC5:0) y n-valérico

(C5:0). Las tablas III.6 y III.7 recogen detalladamente el contenido de cada uno de los ácidos grasos volátiles analizados en los distintos días de toma de muestras, expresado en mg/100 g E.S. Como se puede apreciar, en todos los lotes, y con independencia del día de maduración, el ácido acético fue siempre el mayoritario, hallándose valores comprendidos entre 5 y 43 mg/100 g E.S., lo que representó en todos los casos desde un 80% hasta más del 90% del total de ácidos grasos de cadena corta. Del resto de ácidos grasos analizados, sólo el n-butírico se detectó en concentraciones próximas o superiores a 1 mg/100 g E.S. a lo largo de todo el proceso, y, esporádicamente en algunos lotes, el ácido iso-valérico, como por ejemplo en el lote 10 en el segundo día de maduración (1,87 mg/100 g E.S.) o en el lote 30 en el octavo día de maduración (2,20 mg/100 g E.S.)

En cuanto a la evolución de los distintos componentes de esta fracción, se puede decir que en los **ácidos propiónico, iso-butírico, iso-valérico y n-valérico** no se observó una tendencia definida, dado que los valores hallados no se pueden considerar consistentes. No obstante, pese al comportamiento irregular observado, los valores observados fueron similares a los descritos por otros autores (Halvarson, 1973; Demeyer, 1982; Ordóñez y col., 1989)

El **ácido n-butírico** sufrió un ligero descenso a lo largo del proceso madurativo de 14 días, desde valores iniciales de 1,29 mg/100 g E.S. hasta valores finales en torno a 1 mg/100 g E.S. en los controles e inferiores a estas cifras en el resto de los lotes, excepto el lote 60, en los que se registraron cifras similares a los controles (1,10 mg/100 g E.S.). Este descenso fue mucho más evidente en los lotes de 28 días de maduración, cuya concentración final fue casi siempre inferior a los 0,5 mg/100 g E.S. observados en los controles.

Dainty y col. (1979) han señalado que en aquellos sistemas en los que las bacterias lácticas desarrollan una importante actividad, como las carnes

Tabla III.6. Composición de la fracción de ácidos grasos volátiles (mg/100g E.S.) de los embutidos sometidos a un periodo madurativo de 14 días

Lote	Días	Acidos grasos					
		acético	propiónico	iso-butírico	n-butírico	iso-valérico	n-valérico
Control	0	22,66	0,55	0,14	1,29	0,69	0,24
	2	30,12	0,44	0,19	1,38	0,80	0,22
	6	19,16	0,42	0,19	1,44	0,63	0,20
	10	23,12	0,87	0,36	1,59	1,75	0,22
	14	11,23	0,24	0,13	1,05	0,52	0,13
Lote 10	0	22,67	0,55	0,14	1,29	0,69	0,24
	2	27,58	0,36	0,32	1,44	1,87	0,31
	6	14,09	0,22	0,12	1,17	0,38	0,23
	8	15,30	0,57	0,45	1,40	1,31	0,27
	14	6,78	0,13	0,16	0,96	0,39	0,13
Lote 30	0	22,67	0,55	0,14	1,29	0,69	0,24
	2	24,39	0,86	0,33	1,67	2,28	0,24
	6	20,87	0,30	0,17	1,21	0,97	0,19
	8	20,04	0,21	0,37	1,04	2,20	0,33
	14	7,65	0,14	0,10	0,90	0,35	0,14
Lote 40	0	22,66	0,55	0,14	1,29	0,69	0,24
	2	43,49	0,93	0,26	1,64	0,88	0,13
	6	17,24	0,42	0,19	1,16	0,90	0,20
	10	16,53	0,39	0,21	1,38	0,46	0,12
	14	16,92	0,44	0,14	1,33	1,10	0,22
Lote 60	0	22,66	0,55	0,14	1,29	0,24	0,24
	2	34,61	0,72	0,21	1,47	0,13	0,13
	6	12,56	0,42	0,16	1,31	0,20	0,20
	10	15,25	0,45	0,19	1,13	0,12	0,12
	14	19,73	0,80	0,17	1,25	0,22	0,22

Tabla III.7. Composición de la fracción de ácidos grasos volátiles (mg/100 g E.S.) de los embutidos sometidos a un periodo madurativo de 28 días

Lote	Días	Acidos grasos					
		acético	propiónico	iso-butírico	n-butírico	iso-valérico	n-valérico
<b>Control</b>	0	11,35	0,49	0,11	1,21	0,60	0,17
	2	15,38	0,42	0,08	1,05	0,63	0,20
	6	16,68	0,75	0,08	1,01	0,67	0,38
	12	11,65	0,48	0,08	0,78	0,40	0,29
	19	8,56	0,47	0,08	0,56	0,42	0,24
	28	7,68	0,51	0,08	0,54	0,50	0,24
<b>Lote 3</b>	0	11,35	0,49	0,11	1,21	0,60	0,17
	2	15,11	0,63	0,13	1,27	0,72	0,21
	6	11,11	0,63	0,04	0,73	0,19	0,51
	12	13,99	0,80	0,05	1,00	0,17	0,27
	19	6,21	0,44	0,09	0,60	0,50	0,22
	28	3,39	0,45	0,11	0,56	0,85	0,29
<b>Lote 90</b>	0	11,35	0,49	0,11	1,21	0,60	0,17
	2	17,89	0,67	0,03	0,80	0,62	0,34
	6	13,98	0,72	0,12	0,81	0,45	0,39
	12	7,55	0,56	0,05	0,52	0,40	0,40
	19	7,45	0,53	0,07	0,48	0,30	0,34
	28	7,67	0,47	0,13	0,52	0,64	0,31
<b>Lote 180</b>	0	11,35	0,49	0,11	1,21	0,60	0,17
	2	13,47	0,44	0,07	0,88	0,46	0,28
	6	10,21	0,52	0,11	0,71	0,30	0,35
	12	7,23	0,62	0,08	0,57	0,34	0,46
	19	6,58	0,48	0,07	0,48	0,38	0,36
	28	4,95	0,34	0,07	0,32	0,44	0,36
<b>Lote 250</b>	0	11,35	0,49	0,11	1,21	0,60	0,17
	2	19,58	0,45	0,05	1,02	0,89	0,29
	6	11,90	0,71	0,17	0,91	0,77	0,51
	14	6,66	0,44	0,07	0,45	0,88	0,35
	28	6,56	0,39	0,07	0,36	0,34	0,37
	<b>Lote 500</b>	0	11,35	0,49	0,11	1,21	0,60
2		15,95	0,43	0,05	0,01	0,38	0,21
6		13,88	0,48	0,07	0,74	0,44	0,36
14		9,24	0,41	0,10	0,45	0,60	0,26
28		5,64	0,33	0,06	0,31	0,51	0,37

envasadas al vacío, la presencia de ácido n-butírico no esta relacionada con el metabolismo bacteriano, sino con fenómenos enzimáticos endógenos, es decir, con la actividad de las lipasas propias del músculo. Es posible que en los embutidos suceda lo mismo, con lo que el ácido n-butírico detectado en el presente trabajo se originaría como consecuencia de la actividad temprana de dichas lipasas, que se desarrollaría en la masa original o durante la fermentación, cuando las condiciones de pH y temperatura son más adecuadas para ello (en estas etapas coexisten pH elevados, en torno a 6 y temperaturas relativamente altas, alrededor de 20 °C). El descenso progresivo de este ácido graso que se observó a continuación, aunque en valores absolutos no fue muy acusado, podría deberse al cese de la actividad de las lipasas anteriormente mencionadas como consecuencia de las condiciones ambientales establecidas durante la maduración (pH 5,5 y temperaturas más bajas, en torno a 12 °C) y a la volatilización del ácido n-butírico que se había generado previamente. Sin embargo, partiendo de esta hipótesis, debería haberse detectado de una forma regular una mayor cantidad de este ácido graso en los lotes a los que se añadió lipasa pancreática, pues esta enzima tiene gran actividad sobre la tributirina (Whitaker, 1972), pero ésto no ocurrió, lo que únicamente puede justificarse si se tiene en cuenta que la cantidad de ácido n-butírico esterificado en la grasa de cerdo es sumamente escasa y por lo tanto no sería posible detectarlo, en estado libre, en cantidades mucho mayores.

Como se ha indicado anteriormente, el **ácido acético** fue el componente mayoritario de la fracción ácidos grasos de cadena corta. Para observar más claramente su evolución durante el proceso madurativo de los embutidos experimentales se han confeccionado las figuras III.42 y III.43, que reflejan los cambios en el contenido de este ácido graso (mg/100 g E.S.) en los lotes madurados durante 14 y 28 días respectivamente. El contenido inicial determinado en la masa fresca fue de 11,35 mg/100 g E.S. en los lotes de 14 días de maduración y de 22,66 mg/100 g E.S. en los lotes de 28 días. Estas diferencias podrían deberse a variaciones en el tiempo de premaduración de la

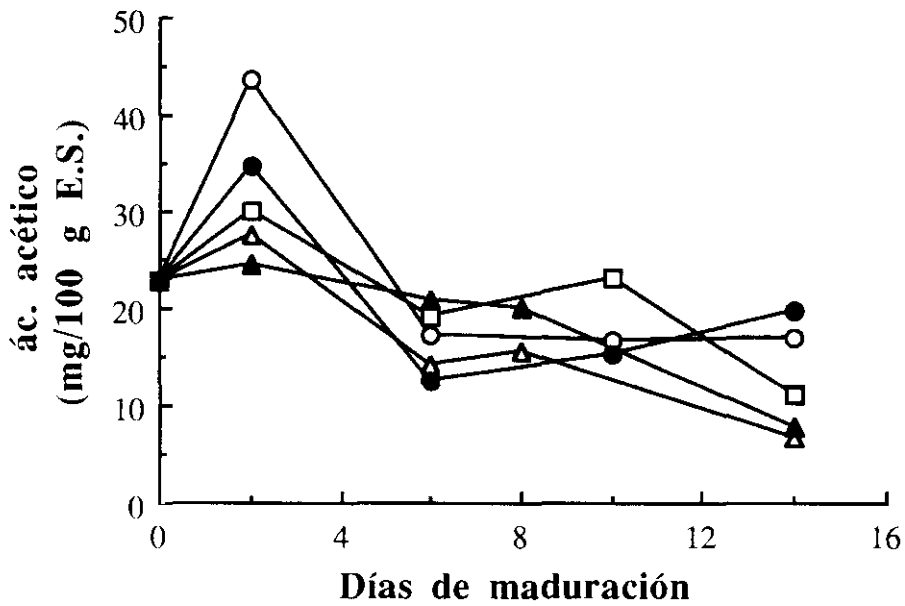


Figura III.42.- Evolución del contenido de ácido acético (mg/100 g E.S.) de los lotes de embutidos madurados durante 14 días: (□) Control; (△) Lote 10; (▲) Lote 30; (○) Lote 40 (●) Lote 60.

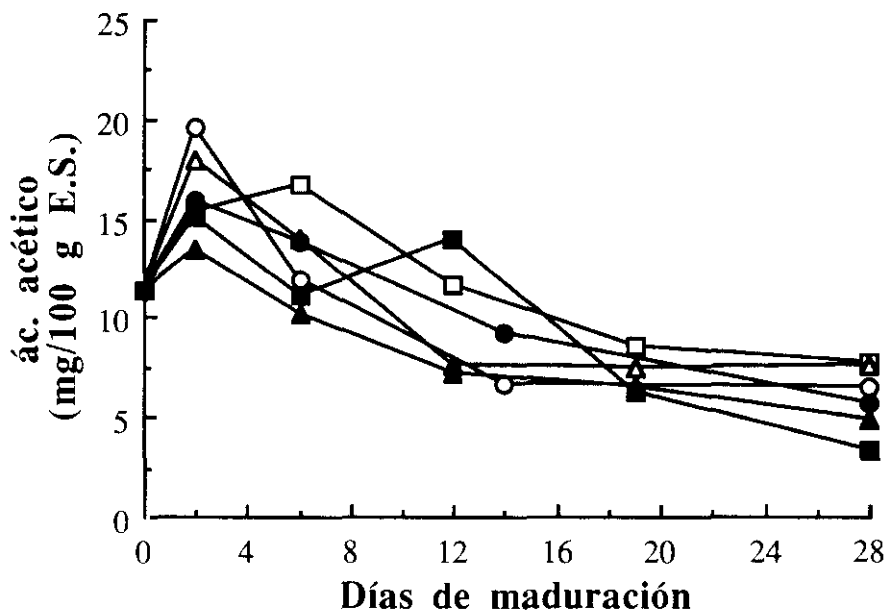


Figura III.43.- Evolución del contenido de ácido acético (mg/100 g E.S.) de los lotes de embutidos madurados durante 28 días: (□) Control; (■) Lote 3; (△) Lote 90; (▲) Lote 180; (○) Lote 250; (●) Lote 500.

masa antes de embutir. Los niveles máximos (que, en general, fueron ligeramente superiores en los embutidos elaborados con lipasa pancreática) se registraron durante la fase fermentativa, tras lo que se observó un descenso suave y continuado hasta el final de la maduración. Los valores finales en los salchichones elaborados con lipasa pancreática fueron generalmente menores (entre 3,39 mg/100 g E.S. en el lote 3 y 7,68 mg/100 g E.S. en el lote 90) con la excepción de los lotes 40 y 60, que presentaron cifras superiores (16,92 y 19,73 mg/100 g E.S. respectivamente) a su correspondiente control (11,23 mg/100 g E.S.).

En relación con la evolución del ácido acético en los embutidos, es interesante tener en cuenta también datos obtenidos en carne envasada al vacío (Dainty y col., 1979) y en atmósferas modificadas (Ordóñez y col., 1991), donde las bacterias lácticas (Shaw y col., 1984) y *Brochothrix thermosphacta* y las bacterias lácticas (Asensio y col., 1988) son, respectivamente, los microorganismos dominantes. Si se asume que la carne fresca contiene aproximadamente un 25% de extracto seco y se comparan las cantidades iniciales de ácido acético descritas en la misma por los autores mencionados con los valores hallados en la masa antes de embutir (día 0 en las figuras III.42 y III.43), se puede deducir que éstos son del orden de 3-4 veces mayores que aquéllos. En principio parece una contradicción, pero por ejemplo, en el trabajo de Ordóñez y col. (1991) se observa que en el día 0 (24 horas "post-mortem"), la tasa bacteriana presente en la carne es del orden de  $10^3/\text{cm}^2$ , pero en días posteriores, cuando las bacterias presentes han alcanzado valores de alrededor de  $10^6/\text{cm}^2$  las cifras de ácido acético detectadas son similares a las registradas en el presente trabajo en la masa inicial, cuya carga microbiana era del mismo orden.

Durante las primeras 48 horas del proceso, correspondientes a la fase fermentativa, los niveles de ácido acético de los embutidos experimentales aumentaron hasta que la flora láctica alcanzó sus niveles máximos (Fig. III.1),

pero a partir de este momento se observó un descenso progresivo hasta el final de la maduración. Esta evolución fue similar en todos los embutidos, tanto los controles como los elaborados con lipasa pancreática. Por lo tanto, se puede llegar a la conclusión que la enzima no produjo ningún efecto en el contenido de este ácido graso, lo que confirma que procede fundamentalmente de la fermentación de los carbohidratos (Dainty y col., 1979; Kandler, 1983). El descenso posterior de la cantidad de acético que se observó puede atribuirse a su papel como intermediario de diversos procesos bioquímicos, por lo que puede transformarse en múltiples compuestos o también (como en el caso del ácido n-butírico) a una progresiva desaparición por volatilización, siempre que su producción no se vea frenada (lo que es muy posible), tras el aumento explosivo de las bacterias lácticas en la fase fermentativa. Domínguez y col. (1991) citan una evolución similar de este ácido graso en el chorizo, partiendo de valores iniciales inferiores a 60 mg/100 g E.S., con un acusado incremento de su contenido durante los primeros 15 días de maduración, en especial durante la fase fermentativa, seguido de un descenso suave en las últimas fases del proceso. Halvarson (1973) y Demeyer (1982) han observado también un rápido incremento de este ácido graso volátil durante las primeras fases de la maduración en distintos embutidos crudos curados.

Finalmente, en este apartado conviene apuntar que, en el análisis cromatográfico de los ácidos grasos volátiles, se comprobó que junto al **ácido iso-valérico** eluía también el ácido metil-butírico, aunque a la hora de expresar los resultados el correspondiente pico se consideró sólo como ácido iso-valérico, ya que éste es el único descrito en la bibliografía consultada al respecto (Halvarson, 1973; Demeyer, 1982; Ordóñez y col., 1989; Ordóñez y col., 1991). Este compuesto se detectó en la masa fresca en niveles próximos a 0,6-0,7 mg/100 g E.S. y evolucionó, al igual que el resto de ácidos grasos de cadena corta, de forma irregular, sin que se observara una tendencia clara. Los valores finales fueron de 0,24-0,52 mg/100 g E.S., excepto el lote elaborado con 40 unidades de lipasa pancreática cuyo contenido final fue 1,10 mg/100 g

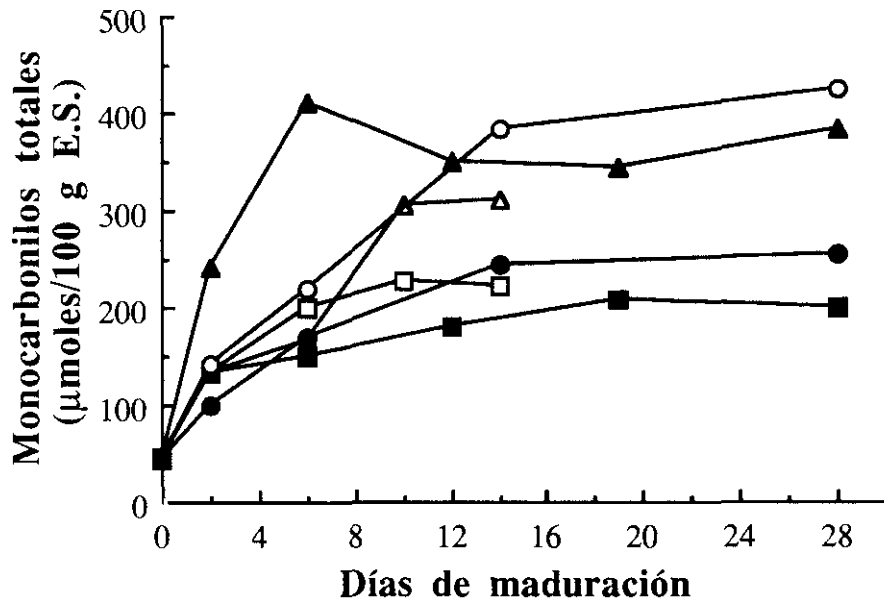
E.S.

### **III.9.- EVOLUCION DE LOS COMPUESTOS MONOCARBONILOS**

Como se ha indicado repetidas veces a lo largo de la introducción, la oxidación de los lípidos es uno de los fenómenos implicados en la formación de compuestos volátiles en los productos cárnicos curados. Estos procesos afectan principalmente a los ácidos grasos insaturados que se hallan en forma libre, aunque también pueden oxidarse cuando están esterificados (Frankel y col., 1990; Neff y col., 1990) y conducen a la generación de distintos compuestos carbonilos a través de la descomposición de los hidroperóxidos formados en primera instancia, sin descartar que estas sustancias volátiles se puedan desarrollar por mecanismos diferentes (Shahidi y col. 1987). El análisis de carbonilos ha sido frecuentemente realizado por diversos autores dada su importante contribución al sabor y aroma de todos estos productos. Concretamente, en los embutidos existen numerosos trabajos al respecto (Cantoni y col., 1966; Wahlroos y Niinivaara, 1969; Langner y col., 1970; Halvarson, 1973; Demeyer y col., 1974; Gökalp, 1986; Melgar y col., 1990; Domínguez y Zumalacárregui, 1991; Chasco y col., 1993).

El objeto del análisis de estos compuestos en el presente trabajo fue el de estudiar si la actividad hidrolítica de la lipasa pancreática añadida a los embutidos determinaba un aumento de la concentración de carbonilos volátiles, así como la acumulación específica de algunos de ellos. Teniendo en cuenta los resultados que ya se habían obtenido referentes a la evolución de otros parámetros analizados en los salchichones experimentales, la determinación de los compuestos carbonilos se llevó a cabo solamente, como lotes representativos, en los elaborados con 60, 90, 250 y 500 unidades de lipasa pancreática y en sus respectivos controles.

En la figura III.44 se recoge la evolución del contenido de los



**Figura III.45.-** Evolución del contenido de compuestos monocarbonilos totales ( $\mu\text{moles}/100 \text{ g E.S.}$ ) de los lotes de embutidos experimentales: (□) Control de 14 días de maduración; (■) Control de 28 días de maduración; (Δ) Lote 60; (▲) Lote 90; (○) Lote 250; (●) Lote 500.

compuestos monocarbonilos totales obtenidos en los embutidos experimentales siguiendo la metodología descrita en el apartado II.3.3.9. Esta técnica detecta los elementos más volátiles de esta fracción y por lo tanto los que más pueden contribuir al aroma de estos productos (Huertas, 1990). Los valores se expresan en micromoles por 100 g de extracto seco ( $\mu\text{moles}/100\text{ g E.S.}$ ).

La masa fresca antes de embutir presentó un contenido medio próximo a  $45\ \mu\text{moles}/100\text{ g E.S.}$  de monocarbonilos totales. En los embutidos controles, estos valores aumentaron acusadamente durante la fase fermentativa, determinándose en el segundo día del proceso tasas unas 3 veces superiores a las iniciales. A este aumento siguió un incremento más moderado y una estabilización a partir de la segunda semana de maduración en valores próximos a  $200\ \mu\text{moles}/100\text{ g E.S.}$  En este sentido, si se comparan las tasas alcanzadas por el control de 14 días de maduración con el de 28 días de maduración, se observa que en el segundo, el valor registrado el día 14 fue similar al obtenido en el primero, permaneciendo a continuación en esos niveles hasta el final del proceso. El contenido de monocarbonilos de los salchichones elaborados con lipasa pancreática mostró una evolución creciente más marcada que los respectivos controles. En todos ellos los valores máximos se alcanzaron al final del proceso y fueron claramente superiores a los registrados en los controles. El contenido final del lote 60 tras 14 días de maduración fue  $312,05\ \mu\text{moles}/100\text{ g E.S.}$  frente a  $221,18\ \mu\text{moles}/100\text{ g E.S.}$  de su control. En cuanto a los embutidos de 28 días, los valores más altos correspondieron a los lotes 90 y 250, con cifras que duplicaron los valores del control ( $199,07\ \mu\text{moles}/100\text{g E.S.}$ ). El lote elaborado con 500 unidades de lipasa presentó cifras menores que las anteriores, correspondientes a embutidos a los que se había añadido menos lipasa. Este último es un resultado extraño, que no se puede justificar en relación con los fenómenos normales asociados a la maduración de los embutidos. La única explicación podría hallarse en una circunstancia ajena al proceso, relacionada con las impurezas (proteasas y amilasas) que contenía el extracto enzimático utilizado y de las que

la firma suministradora (Sigma) informaba en la etiqueta. La actividad proteolítica del extracto se determinó incubando el mismo con azocaseína a dos temperaturas distintas (24 °C y 12 °C) durante 2 horas, tras lo cual se realizó una determinación espectrofotométrica a 440 nm. Se definió la unidad de actividad proteolítica como la que determinaba una absorbancia de 1,0 a 440 nm después de 2 horas de incubación a una temperatura concreta y se observó que el extracto presentaba su mayor actividad (de 0,25 unidades por mg) a 24 °C, siendo a 12°C del orden de 3 veces menor. Teniendo en cuenta que al lote 500 se incorporaron 10,72 g de extracto enzimático, las unidades añadidas a dicho lote (a 24 °C) fueron 2680. De esta forma, al añadir dicha cantidad de lipasa a los embutidos se incorporó al mismo tiempo una importante cantidad de proteasas procedentes de las impurezas del extracto, lo que ocasionó, sin duda, un aumento de los productos derivados de la proteólisis, sobre todo en la fase fermentativa, que es cuando dicho fenómeno se manifiesta con mayor intensidad (Díaz y col., 1992). Entre estas sustancias se pueden encontrar aminoácidos, que al reaccionar con los carbonilos (Córdoba, 1990) podrían evitar su detección al analizar esta fracción.

En la bibliografía consultada se describen amplios márgenes en el contenido de compuestos carbonilos en los distintos embutidos crudos curados. Estos límites oscilan entre los 75  $\mu$ moles/100 g E.S., observados en chorizo de León (Domínguez y Zumalacárregui, 1991) y valores de hasta 1400  $\mu$ moles/100 g E.S. citados por Langner (1972) en distintos tipos de salami. Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con los citados por Demeyer y col. (1974) y Deketelaere y col. (1974) en embutidos belgas, Gökalp (1986) en el "soujouk" turco y también con los obtenidos por Domínguez y Zumalacárregui (1991) en chorizo artesanal de León.

En la mayoría de los trabajos existentes sobre este tema se refleja un aumento generalizado del contenido de compuestos monocarbonilos a lo largo de la maduración, si bien algunos autores (Dimick y Macneil, 1970; Dimick y

col., 1972; Harris y Lindsay, 1972; Bothast y col., 1973; Misock y col., 1979; Gökalp, 1986) han señalado un descenso en las últimas etapas del proceso madurativo de distintos productos curados (incluidos los embutidos), descenso que atribuyen a su destrucción por los microorganismos durante esta fase final. Otros investigadores explican este descenso mediante la reacción de los carbonilos con aminoácidos (especialmente aminoácidos básicos) que se liberan a partir de las proteínas musculares (Córdoba, 1990), hecho que se ve favorecido por las condiciones físico-químicas (sobre todo pH y  $a_w$ ) que se crean en estos productos durante la maduración (López-Bote y col., 1990).

Entre los compuestos carbonilos, los aldehídos se caracterizan porque presentan muy bajas concentraciones umbral de respuesta olfatoria. Por ello, y a modo de guía de los procesos oxidativos de los embutidos, tras la obtención de la fracción de monocarbonilos totales se procedió al análisis de los aldehídos constituyentes de la misma por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) según se indica en el citado apartado II.3.3.9.

En las muestras analizadas se detectaron los siguientes componentes: n-hexanal (C6), 2-hexenal (2C6), n-heptanal (C7), 2-heptenal (2C7), n-octanal (C8), 2-octenal (2C8), n-nonanal (C9), 2-nonenal (2C9), 2,4-nonadienal (2,4C9) y 4-decenal (4C10). Los tres últimos se detectaron muy irregularmente a lo largo de la maduración de todos los lotes, por lo que no se tuvieron en cuenta para los cálculos finales. Tampoco se hizo hincapié en el análisis de los aldehídos con menos de 6 átomos de carbono, ya que, según Loury (1972), estos compuestos aparecen en cantidades muy reducidas cuando se utilizan temperaturas moderadas de maduración. La composición, en porcentajes relativos, de la fracción de aldehídos de los embutidos experimentales a lo largo de la maduración se recoge en las tablas III.8 y III.9.

En todas las muestras se detectaron los mismos aldehídos, a lo largo del proceso madurativo, pero se observaron variaciones en la contribución relativa

Tabla III.8. Aldehídos (% del área del cromatograma) de los embutidos experimentales sometidos a un periodo madurativo de 14 días

Lote	Días	Aldehídos (%)							Sat./ Insat.
		C6	2C6	C7	2C7	C8	2C8	C9	
Control	0	93,38	0,30	0,88	0,17	0,28	0,16	0,30	150,54
	2	95,39	0,80	1,85	0,65	0,83	0,15	0,33	61,50
	6	95,67	1,08	1,83	0,62	0,45	0,11	0,21	54,23
	10	96,28	1,16	1,13	0,39	0,50	0,19	0,39	56,49
	14	90,27	2,02	3,30	1,58	1,21	0,63	0,58	22,54
Lote 60	0	93,38	0,30	0,88	0,17	0,28	0,16	0,30	150,54
	2	95,65	0,84	1,13	0,23	0,21	0,10	0,18	83,05
	6	91,20	4,43	2,32	0,51	0,70	0,10	0,45	18,78
	10	93,18	1,33	3,34	0,90	0,79	0,17	0,27	40,66
	14	89,41	1,30	3,78	1,80	1,63	0,91	0,94	23,88

C6 n-hexanal  
 2C6 2-hexenal  
 C7 n-heptanal  
 2C7 2-heptenal  
 C8 n-octanal  
 2C8 2-octenal  
 C9 n-nonanal

Tabla III.9. Aldehídos (% del área del cromatograma) de los embutidos experimentales sometidos a un periodo madurativo de 28 días

Lote	Días	Aldehídos (%)							Sat./ Insat.
		C6	2C6	C7	2C7	C8	2C8	C9	
Control	0	95,81	0,11	1,26	0,42	0,73	0,55	0,95	91,44
	2	88,86	3,66	1,34	1,42	1,00	2,22	1,17	12,65
	6	92,49	0,81	1,56	1,37	0,98	1,60	0,97	25,40
	12	92,94	0,68	1,15	1,12	0,71	1,35	0,82	30,36
	19	93,59	1,03	1,22	1,37	0,61	1,16	0,69	27,00
	28	91,71	1,08	1,37	1,84	0,91	1,87	0,90	19,81
Lote 90	0	95,81	0,11	1,26	0,42	0,73	0,55	0,95	91,44
	2	88,05	1,34	1,80	2,63	1,39	3,01	1,40	13,27
	6	91,12	0,88	1,75	1,55	1,18	2,07	0,94	21,11
	12	89,11	4,22	1,49	1,81	0,83	1,46	0,73	12,30
	19	88,34	1,57	2,40	2,75	1,42	2,51	0,72	13,60
	28	91,76	2,34	1,40	1,11	0,84	1,59	0,75	18,80
Lote 250	0	95,81	0,11	1,26	0,42	0,73	0,55	0,95	91,44
	2	84,45	1,62	2,51	2,54	1,40	3,19	3,28	12,47
	6	85,06	3,05	2,91	2,97	1,42	2,72	1,47	10,40
	14	92,20	0,78	2,23	1,56	1,01	1,21	0,85	27,12
	28	96,64	0,63	1,64	0,48	0,30	0,14	0,16	78,99
	Lote 500	0	95,81	0,11	1,26	0,42	0,73	0,55	0,95
2		77,28	1,66	4,46	4,16	1,08	4,25	4,10	8,63
6		90,28	1,47	2,81	1,08	1,44	1,04	1,59	26,77
14		90,97	0,59	3,12	1,46	1,52	1,08	1,10	30,90
28		95,74	1,35	1,65	0,41	0,42	0,18	0,24	50,54

C6 n-hexanal  
 2C6 2-hexenal  
 C7 n-heptanal  
 2C7 2-heptenal  
 C8 n-octanal  
 2C8 2-octenal

de los mismos a esta fracción. Los aldehídos saturados fueron los más abundantes en todas las muestras analizadas y el mayoritario fue siempre el hexanal, que constituyó siempre más de las 3/4 partes del total.

Como se puede observar en la tabla III.8., en los embutidos madurados durante 14 días el porcentaje de hexanal siempre fue superior al 90%, mientras que el resto de los aldehídos analizados se detectaron en concentraciones iniciales inferiores al 1%. Los insaturados fueron los minoritarios. A lo largo del proceso madurativo se registró un aumento generalizado y progresivo de todos los aldehídos, excepto el hexanal, cuyo contenido final fue ligeramente inferior que el inicial, lo que, lógicamente, compensó el aumento de los demás. Por otro lado, los valores finales del lote elaborado con 60 unidades de lipasa pancreática fueron en general, ligeramente superiores a los del control. En los embutidos de 28 días de maduración (tabla III.9) se observó un hecho similar, aunque de forma menos manifiesta, ya que en los lotes 250 y 500, los porcentajes finales de hexanal fueron parecidos a los originales.

Puesto que el origen de estos compuestos es principalmente la descomposición de los productos primarios y secundarios de la oxidación de los lípidos, conviene recordar que el hexanal es uno de los productos principales de la degradación de los ácidos grasos de la serie n-6, sobre todo del ácido linoleico (Peerson y Von Sidow, 1973; Henderson y col., 1980; Frankel, 1991). El 2,4-decadienal es también un producto típico de la oxidación de este ácido graso, aunque estudios previos señalan que el n-hexanal predomina entre los volátiles originados en la oxidación de los lípidos a bajas temperaturas (como es el caso de los embutidos), mientras que a mayor temperatura se forma más 2,4 decadienal (Nawar, 1989). En la oxidación del ácido oleico se forman alcanales de cadena más larga (n-heptanal, n-octanal, n-nonanal, 2-decenal), con proporciones muy pequeñas de aldehídos de 6 ó menos átomos de carbono (Loury, 1972; Labuza, 1976; Ladikos y Lougovois, 1990), mientras que el ácido linolénico y sus homólogos de la serie n-3 se

consideran precursores de aldehídos insaturados y propanal (Grosch, 1987).

Estos resultados concuerdan con los registrados por los distintos autores que han trabajado en este tema. El absoluto predominio de los aldehídos saturados (hexanal) sobre los insaturados es un hecho observado en la mayoría de los trabajos al respecto de la oxidación lipídica en distintos productos cárnicos (Dimick y col., 1972; Moerck y Hershell, 1979; Gadzheva y col., 1982; Melgar y col., 1990; Antequera y col., 1992; Chasco y col., 1992). De todos modos y a pesar de ser mayoritario entre los aldehídos, el hexanal, principal componente de los volátiles de las carnes no curadas, va desapareciendo gradualmente durante la maduración de los productos curados (Shahidi y col., 1986). Su contenido parece ser directamente proporcional al valor TBA (TBARS), que es el índice de enranciamiento de la grasa más utilizado, por lo que la cantidad de hexanal se puede considerar como un buen indicador del grado de oxidación lipídica a lo largo de la maduración (Shahidi y col., 1987).

### **III.10.- ANALISIS SENSORIAL**

Al final de la maduración de cada lote, una vez concluido el análisis químico y microbiológico y el estudio de los fenómenos lipolíticos de los embutidos experimentales, se realizó un análisis sensorial del producto acabado, con el fin de observar desde el punto de vista del consumidor las posibles diferencias relacionadas con la adición de distintas concentraciones de lipasa pancreática a los embutidos. Se efectuaron dos pruebas, una triangular (para observar si existían diferencias significativas entre los embutidos con lipasa y sus respectivos controles) y una preferencial (mediante la que los catadores evaluaron distintos atributos de calidad de los embutidos: color y apariencia, textura y sabor y aroma o "flavor"). El protocolo seguido para la realización de estas pruebas se recoge más detalladamente en el apartado II.3.3.10.

Los resultados de la **prueba triangular** se recogen en la tabla III.10. De acuerdo con las especificaciones de la norma I.S.O. TC/34CS 12, esta prueba reveló diferencias significativas con un nivel  $p < 0,001$  en el lote 500. Los lotes 60 y 90 presentaron diferencias con un nivel  $p < 0,01$ , mientras que tanto en el lote 40 como en el 180 se observaron también diferencias pero con un nivel  $p < 0,05$ . En el resto de los embutidos elaborados con lipasa pancreática no se llegó al número mínimo de respuestas correctas requerido para poder establecer diferencias significativas con los embutidos controles. Las diferencias significativas observadas en los lotes 40, 60, 90 y 180 y las del lote 500 deben analizarse desde dos puntos de vista distintos. De la prueba preferencial (como se expondrá en párrafos siguientes) se puede deducir que las diferencias observadas en los lotes 40-180 fueron positivas, mientras que en el lote 500, los resultados fueron negativos, ya que se debieron a defectos en las características organolépticas originados por la adición de lipasa pancreática y que se discutirán detalladamente más adelante.

Los resultados de la **prueba preferencial** se recogen en la tabla III.11. En ella figuran las puntuaciones obtenidas por las 3 características sensoriales evaluadas en todos los lotes, así como la calidad global (obtenida según se indica también en el apartado II.3.3.10). Para todas estas características se utilizó una escala de 1 a 10. En la citada tabla figura como control una media de todos los embutidos controles, ya que el panel de catadores puntuó de igual manera tanto los madurados durante 14 días como los de 28 días.

Analizando individualmente las diferentes características evaluadas, el color y la apariencia alcanzaron una puntuación comprendida entre 7,40 (lotes 60 y 90) y 6,42 (lote 30), intervalo en el que también se incluyeron los embutidos elaborados sin lipasa pancreática (7,34). El lote 500 obtuvo solamente un valor de 4,38, derivado probablemente de la separación de la tripa que en él se observó, unida a una manifiesta consistencia "filante" al corte, con la fluidez de un gel.

Tabla III.10. Resultados de la prueba triangular a la que se sometieron los embutidos experimentales frente a un jurado de catadores compuesto por 20 miembros

Lote	Unidades añadidas	% de acierto	Nivel de significación (p<)
Lote 3	3	40,0	n.s.
Lote 10	10	30,0	n.s.
Lote 30	30	35,0	n.s.
Lote 40	40	55,0	< 0,05
Lote 60	60	65,0	< 0,01
Lote 90	90	65,0	< 0,01
Lote 180	180	55,0	< 0,05
Lote 250	250	40,0	n.s.
Lote 500	500	100,0	< 0,001

n.s.: no significativo ( $p > 0,05$ )

En el caso de la textura, todos los lotes elaborados con lipasa pancreática registraron puntuaciones inferiores a los controles, en especial los embutidos elaborados con mayor cantidad de enzima. El lote 500 obtuvo la peor puntuación, mientras que los embutidos mejor evaluados fueron los correspondientes a los lotes 3, 40, 60 y 90, con valores comprendidos entre 6,28 y 6,62, no muy alejados del registrado en el control (6,80). No se observó una relación lineal con la cantidad de enzima añadida.

Las bajas puntuaciones obtenidas por la textura de los lotes elaborados con los mayores niveles de lipasa pancreática (lotes 180, 250 y 500) se debió posiblemente a un ablandamiento excesivo de la masa, que el jurado de catadores evaluó negativamente. Además, como ya se ha hecho referencia en párrafos anteriores, el lote 500 se caracterizó por una fluidez manifiesta en el producto final. Este fenómeno puede atribuirse, con toda probabilidad, al contenido de ácido oleico libre. El punto de fusión de este ácido graso es de +4°C (Merck, 1989); cuando se encuentra esterificado, contribuye, de acuerdo con su concentración y en combinación con los demás ácidos grasos, a que la grasa de cerdo presente un punto de fusión de 36-48 °C (Casares, 1954), que por lo tanto es sólida a temperatura ambiente. Sin embargo, como consecuencia de la acción de la lipasa pancreática, se produce una gran liberación de este ácido graso, que, si se acumula en grandes cantidades, permite que la grasa presente un estado fluido. En este sentido hay que tener en cuenta que el ácido oleico es el mayoritario de la grasa de cerdo y que en el lote 500 se detectó, en estado libre, en niveles próximos al 9% sobre extracto seco. Esta circunstancia es la que determinó que el jurado de catadores otorgara puntuaciones tan negativas tanto a la apariencia como a la textura del lote 500. En el lote 250, aunque en el análisis sensorial no se detectó este fenómeno de una forma tan manifiesta, sí que se pudo apreciar una mayor viscosidad de la muestra durante su manipulación para la realización de los análisis correspondientes.

Tabla III.11. Efecto de la adición de distintas concentraciones de lipasa pancreática en las características sensoriales de los embutidos experimentales (escala 1-10) evaluadas por un jurado de catadores compuesto por 20 miembros

Lote	Unidades añadidas	Color y apariciencia	Textura	"Flavor"	Calidad global
Control	0	7,34	6,80	7,03	7,00
Lote 3	3	6,84	6,62	6,99	6,88
Lote 10	10	6,70	5,28	7,18	6,66
Lote 30	30	6,42	5,70	7,23	6,77
Lote 40	40	7,30	6,40	7,25	6,91
Lote 60	60	7,40	6,28	8,02	7,52
Lote 90	90	7,40	6,40	7,30	7,08
Lote 180	180	7,20	5,60	7,10	6,73
Lote 250	250	6,74	5,12	6,87	6,42
Lote 500	500	4,38	3,24	4,49	4,17

$$\text{Calidad global} = (\text{color y apariciencia} \times 0,1) + (\text{textura} \times 0,25) + (\text{"flavor"} \times 0,65)$$

Por otra parte, el mayor ablandamiento observado en los lotes 180, 250 y 500, además de deberse a la mayor viscosidad del producto producida por la liberación de ácido oleico, es posible que derive, también, de las impurezas que contenía el extracto enzimático utilizado (aunque era de gran calidad) y a las que ya se ha hecho referencia en el apartado III.8.

El "flavor" es la característica sensorial que más influye en la calidad global de un producto (en este trabajo se ha estimado en un 65%) y está íntimamente relacionado con la fracción lipídica de los productos cárnicos curados (Piotrowski y col., 1970; Alford y col., 1971; Palumbo y Smith, 1977; Lücke, 1988; Naes y col., 1992), lo que parece corroborar el hecho de que fue, en general, la cualidad mejor puntuada en todos los lotes con lipasa pancreática, aunque en los embutidos del lote 500, algunos miembros del jurado apreciaron la existencia de un sabor amargo, lo que determinó puntuaciones más bajas que en el resto. En este sentido, la adición de lipasa pancreática en niveles entre 10 y 180 unidades se puede considerar como favorable para el desarrollo del sabor y aroma de los embutidos, ya que las puntuaciones otorgadas por el jurado de catadores a los lotes correspondientes fueron superiores a las del control (7,03), en especial el lote 60 cuya puntuación (8,02) fue la más alta. Este comportamiento del lote 60 podría estar ligado a las mayores concentraciones de aldehídos detectadas en dicho lote al final del proceso madurativo, aunque fue sólo de 14 días, en relación con su control. Similares consideraciones pueden hacerse en el lote 90, al que los catadores puntuaron en segundo lugar. El resto de concentraciones de enzima utilizadas determinaron puntuaciones menores que las de los dos lotes citados y, menores también, que la puntuación media de los embutidos control.

Por último, la calidad global, calculada a partir de las características sensoriales descritas anteriormente, mostró que sólo dos lotes, los elaborados con 60 y 90 unidades de lipasa pancreática, superaron la puntuación media alcanzada por los embutidos controles. Los lotes 10, 30, 40 y 180 no llegaron

(aunque alguno registró valores muy próximos) a la puntuación de 7,0 del control, a pesar de que su "flavor" fue calificado, en todos ellos, con una nota superior.

En definitiva, los resultados obtenidos en la prueba preferencial del análisis sensorial coinciden totalmente con los de la prueba triangular; los lotes 60 y 90 fueron los que mostraron las diferencias significativas a una mayor nivel ( $p < 0,01$ ) respecto al control. Las diferencias observadas en el lote 500 ( $p < 0,001$ ) no merecen comentarios, puesto que fueron negativas.

Por lo tanto, del análisis sensorial se desprende que la adición de lipasa pancreática a los embutidos influyó positivamente en el desarrollo de las características sensoriales de los mismos cuando se utilizaron 60 y 90 unidades de la enzima, independientemente de la duración del proceso madurativo, mientras que el empleo de mayor cantidad de enzima determinó un descenso de la calidad global. Estas observaciones ratifican parcialmente los resultados obtenidos en el análisis del material lipídico.

Puesto que los lotes de embutidos experimentales correspondientes a la adición de 60 y 90 unidades de lipasa pancreática, fueron los que presentaron mejores características sensoriales, parece conveniente recordar brevemente los resultados relativos a dichos lotes.

En primer lugar, la adición de las citadas cantidades de enzima no determinó modificaciones significativas ni en la evolución de la flora microbiana habitual ni en los parámetros químicos generales que caracterizan a este tipo de productos (pH, aw, contenido de humedad), pero sí que produjo notables diferencias en las características del material lipídico en comparación con los embutidos que se utilizaron como controles. Estas diferencias se podrían resumir en las siguientes:

- se registró una mayor acumulación de los productos de la hidrólisis de los triglicéridos que la que se observó en los salchichones controles. Las cantidades finales de dichos compuestos en los embutidos del lote 60 fueron del orden de 1,5 veces (en el caso de los monoglicéridos) y de 3 veces (en el caso de los diglicéridos y ácidos grasos libres) superiores que en los controles. En el lote 90 fueron del orden de 2 (monoglicéridos), 3,5 (ácidos grasos libres) y 9 veces (diglicéridos).

- en cuanto a los porcentajes relativos de los siete ácidos grasos mayoritarios en la fracción de ácidos grasos libres (mirístico, palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico) al final de la maduración, los ácidos oleico y mirístico alcanzaron los valores mayores en comparación con los controles, se observó un aumento más moderado de esteárico y palmitoleico y un descenso del resto, más destacado en el caso del ácido linoleico. No obstante, debido al mayor contenido de ácidos grasos libres de estos embutidos, todos los ácidos grasos principales duplicaron como mínimo las concentraciones presentes en los embutidos controles, siendo este incremento más evidente en el caso del ácido mirístico (5,20 en el lote 60 y 5,20 en el lote 90), palmitoleico (3,37 en el lote 60 y 4,33 en el 90), oleico (3,26 en el lote 60 y 4,0 en el 90) y esteárico (3,18 en el lote 60 y 3,0 en el 90).

- en el análisis de los ácidos grasos de cadena corta no se observaron diferencias importantes que permitieran extraer conclusiones definidas.

- por último, en relación con el contenido de monocarbonilos totales, en los lotes 60 y 90 las tasas finales superaron en un 40% y un 90%, respectivamente, las de los respectivos controles. La composición porcentual de esta fracción no mostró grandes diferencias con la de un salchichón control. No obstante, quizá sea esta fracción la que contribuyó en mayor medida a la mejor puntuación que se logró en estos dos lotes en el aspecto del "flavor", lo

que posiblemente se debió a los procesos oxidativos que sufrió el ácido linoleico, dado que el hexanal fue el monocarbonilo mayoritario de los analizados.

---

*CAPITULO IV*  
*DISCUSION GENERAL*

---

Un embutido en maduración es un sistema bioquímico muy complejo donde se establecen numerosos equilibrios y se entrecruzan múltiples rutas de degradación y síntesis, en las que el producto de una de ellas se convierte, con frecuencia, en sustrato de otras. La composición de un embutido sufre, por ello, gran cantidad de cambios a lo largo de todo el proceso. En el curso de la maduración se modifica la textura y se van acumulando los distintos compuestos que contribuyen al sabor y aroma (péptidos, aminoácidos, aminos, aldehídos, cetonas, ácidos grasos libres y otros ácidos orgánicos, etc.). Estas sustancias (muchas de ellas ausentes y otras presentes en bajas concentraciones en las carne y grasa originales) surgen como consecuencia de las transformaciones químicas y bioquímicas de los componentes mayoritarios de la materia prima (proteínas y grasa) a las que no son ajenas otras sustancias intencionadamente añadidas (azúcares, especias y otros condimentos) al preparar la masa inicial.

Sin restar importancia a los procesos de síntesis, especialmente de aldehídos, ácidos orgánicos, etc., es indudable que durante la maduración de los embutidos predominan los procesos hidrolíticos: glicolisis, proteolisis y los fenómenos degradativos que afectan a la grasa (lipolisis y autooxidación).

La glicolisis corre a cargo de la flora láctica que espontáneamente se instala en la masa original o que se añade intencionadamente a la misma. Estos microorganismos metabolizan los azúcares añadidos, lo que se traduce fundamentalmente en la acumulación de ácido láctico, que ocasiona un descenso del pH, aunque también se produce la generación, en pequeña cuantía, de otras sustancias, como el ácido acético, que contribuyen al sabor y aroma finales o pueden potenciar otras reacciones.

La proteolisis provoca una fragmentación parcial de las proteínas musculares, formándose fracciones nitrogenadas de más bajo peso molecular. Es un proceso gradual que puede alcanzar distintos niveles: formación de

polipéptidos de diferente tamaño en primer lugar y generación posterior de oligopéptidos y aminoácidos libres bajo la acción catalítica de enzimas apropiadas procedentes del propio músculo o de los microorganismos dominantes. Los aminoácidos pueden sufrir reacciones de descarboxilación, desaminación o transaminación, rindiendo, respectivamente, aminas, amoniaco y el  $\alpha$ -cetoácido correspondiente y otros aminoácidos. Todos estos fenómenos proteolíticos afectan tanto al sabor y aroma como a la textura, ya que producen una progresiva solubilización de las proteínas de la masa.

La lipólisis, en cambio, no afecta a la textura, a menos que sea muy intensa, y se manifiesta, en primer lugar, por la rotura del doble enlace éster de los triglicéridos -los lípidos mayoritarios- rindiendo glicéridos parciales y ácidos grasos libres que se acumulan en el medio o quedan dispuestos para sufrir transformaciones posteriores, vía química mediante reacciones autooxidativas que rinden aldehídos, cetonas, ácidos grasos, etc. o vía microbiana, en la que los mohos superficiales pueden jugar un importante papel (Geisen y col., 1992; Jansen y col., 1992) en el sabor y aroma al ocasionar la formación, entre otras sustancias, de metilcetonas y alcoholes secundarios (Fors, 1979; Frutos y col., 1991).

Ante este panorama, es razonable pensar que al añadir intencionadamente a los embutidos enzimas de la misma naturaleza que los que participan en el proceso madurativo (proteasas y lipasas fundamentalmente) se podría incrementar la acción catalítica de los mismos y, en consecuencia, lograr una potenciación del sabor y aroma o, alternativamente, acortar el periodo madurativo de estos productos. Con esta base se ha investigado el efecto de la adición de lipasa pancreática a los embutidos.

Los resultados obtenidos han mostrado que la adición de lipasa pancreática ocasionaba, como era de esperar, un incremento de la tasa de

ácidos grasos libres durante la maduración, aunque no de forma proporcional a la cantidad de enzima añadida. Igualmente, se observó un incremento del contenido de compuestos monocarbonilos, que influyen poderosamente en el sabor y aroma. Sin embargo, no se apreció un incremento de los ácidos grasos de cadena corta. Todos estos resultados han permitido la obtención de algunos lotes de embutidos con unas características sensoriales mejores que las de los controles, sobre todo en lo referente al sabor y aroma. En definitiva, se ha demostrado la hipótesis planteada inicialmente, habiéndose establecido las cantidades de lipasa pancreática más idóneas para tal fin en 60 y 90 unidades, entendiéndose por 1 unidad de actividad de la enzima como "la cantidad de la misma que hidroliza 1 miliequivalente de ácido graso a partir de aceite de oliva en 1 hora a 37 °C y pH 7,7".

Sin embargo, los efectos no han sido espectaculares; en principio cabía esperar diferencias más marcadas entre los embutidos controles y los elaborados con la enzima. El análisis sensorial mostró que los resultados eran significativamente diferentes ( $p < 0,01$ ) entre los lotes 60 y 90 y los controles, pero la puntuación global alcanzada por aquéllos no fue tan distinta como para concluir que la mejora obtenida era manifiestamente importante. Por lo tanto, no se puede aconsejar categóricamente que la adición de lipasa pancreática pueda, desde un punto de vista industrial, aportar unos beneficios notables que permitan obtener productos competitivos con los elaborados por métodos tradicionales.

Se podía esperar que el aumento considerable de la tasa de ácidos grasos libres que se logró en los embutidos con lipasa (los niveles de ácidos grasos libres presentes en los embutidos controles se multiplicó por un factor de 3 y 3,5 en los lotes elaborados con 60 y 90 unidades de lipasa pancreática respectivamente) ocasionara un correspondiente aumento de muchas de las sustancias que contribuyen al sabor y aroma de los embutidos y que en el presente trabajo se evaluaron mediante la determinación y análisis de los

compuestos monocarbonilos. Sin embargo, en el caso más favorable en el que la adición de la enzima no produjo efectos negativos (lote 90), el contenido de estos compuestos se multiplicó por un factor de 2, mientras que los ácidos grasos libres lo hicieron por un factor de 3,5. Así pues, hay que deducir que la generación de este tipo de sustancias es lenta y gradual y no parece posible que se pueda acelerar mediante el aumento de la tasa de ácidos grasos libres. Quizá el empleo de periodos madurativos más largos que los utilizados en el presente trabajo (28 días como máximo) permita obtener diferencias más marcadas entre embutidos elaborados con y sin lipasas. Cabe señalar al respecto que en la maduración de queso Parmesano se añade, junto con el cuajo, lipasa pancreática para potenciar el sabor (Botazzi, 1965; Moskowitz, 1980), pero su proceso madurativo es muy largo, pudiendo llegar, incluso a los 2 años.

Por último, también es posible que otras lipasas, tanto microbianas como de otro origen, proporcionen resultados más destacados, sobre todo si su especificidad recae sobre los enlaces donde están esterificados los ácidos grasos poliinsaturados. Por otra parte, manipulando las condiciones de la maduración, sobre todo las referentes a las temperatura, quizás podrían obtenerse diferencias más notables. Estas consideraciones son simplemente especulativas, pero pueden servir de punto de partida para ampliar los estudios descritos en esta memoria, porque lo que sí es seguro es que en las condiciones en las que se ha utilizado la lipasa pancreática no se mejoró ostensiblemente el resultado final modificando la dosis de enzima, teniendo en cuenta que se utilizó un amplio intervalo de cantidades (de 3 a 500 unidades).

En otro orden de cosas, se observó que el aumento de la liberación de ácidos grasos al añadir lipasa pancreática a los embutidos se manifestó principalmente en las primeras 48 horas del proceso madurativo, es decir, durante la fase fermentativa. Puede que este hecho esté relacionado con el pH de la carne (en torno a 6) y la temperatura de maduración (superior a 20 °C) imperantes durante dicha fase. Cabe pensar, pues, en la posibilidad de añadir la

enzima a la masa original antes del periodo de reposo en refrigeración de 24 horas que habitualmente se utiliza previamente al embutido, dejándola un cierto tiempo en premaduración.

Finalmente, sólo queda por volver a destacar que con anterioridad no se había realizado investigación alguna sobre el tema. Por lo tanto, los datos recogidos en esta memoria son resultados previos, que pueden, en un futuro, servir de base para investigaciones posteriores en diversas direcciones, algunas de las cuales ya se han enunciado en este apartado.

---

*CAPITULO V*  
*CONCLUSIONES*

---

- Primera.** El análisis de los parámetros microbiológicos (flora total, flora láctica y microcoáceas) y físico-químicos (pH, aw y contenido de humedad) que caracterizan a los embutidos crudos curados demostró que la adición de lipasa pancreática no ocasiona modificaciones importantes en dichas características, siendo similares a las observadas en los embutidos utilizados como control.
- Segunda.** En los embutidos elaborados con lipasa pancreática, como era de esperar, se pudo apreciar una mayor acumulación de los productos de la hidrólisis de los triglicéridos, en especial de diglicéridos y de ácidos grasos libres.
- Tercera.** La actividad hidrolítica de la lipasa sobre los triglicéridos determinó principalmente la liberación de los ácidos grasos oleico y linoleico. Se observó un notable incremento del contenido porcentual de ácido oleico en todos los lotes experimentales, mientras que el de ácido linoleico descendió progresivamente a lo largo de la maduración, probablemente debido a su degradación como consecuencia de fenómenos autooxidativos.
- Cuarta.** Los resultados referentes al análisis de la fracción ácidos grasos de cadena corta de los embutidos experimentales no fueron consistentes, lo que hace suponer que la lipasa pancreática no afecta a la composición de dicha fracción.
- Quinta.** En todos los lotes de embutidos elaborados con lipasa pancreática se observó un aumento del contenido de compuestos monocarbonilos, siendo el hexanal el componente mayoritario. No obstante, este incremento no se correspondió linealmente con el aumento de los ácidos grasos libres, posiblemente debido a que la

generación de monocarbonilos es un proceso más lento y gradual que la hidrólisis de triglicéridos.

**Sexta.** El análisis sensorial únicamente reflejó diferencias positivas con un nivel alto de significación entre los embutidos controles y los elaborados con 60 y 90 unidades de lipasa pancreática. La característica sensorial mejor evaluada fue el sabor y aroma, lo que se relacionó con el elevado contenido de monocarbonilos de dichos lotes; por ello, se puede concluir que la adición de lipasa pancreática a los embutidos ejerce un efecto positivo (aunque no muy marcado) en relación con dicha característica.

**Séptima.** De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, se puede afirmar que, de todas las cantidades de lipasa pancreática utilizadas, las más adecuadas para la mejora de las características sensoriales fueron las de 60 y 90 unidades. No obstante, los resultados no fueron totalmente concluyentes, por lo que estas investigaciones iniciales pueden servir de base para experiencias futuras. Probablemente el empleo de otras condiciones de maduración y/o de otras lipasas, microbianas o de otro origen, pueda proporcionar resultados más favorables.

---

*CAPITULO VI*  
***BIBLIOGRAFIA***

---

- ACKER, L. (1962). *Adv. Food Res.* **11**, 263.
- ACTON, J. C. y DICK, R. L. (1976). *J. Food Sci.* **41**, 971.
- ACTON, J. C.; DICK, R. L. y NORRIS, E. L. (1977). *J. Food Sci.* **42**, 174.
- ADAMS, J. B. (1991). *Int. J. Food Sci. Technol.* **26**, 1.
- ADLER-NISSEN, J. (1986). En *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*. Elsevier Applied Science Publishers, Londres.
- ALFORD, J. A., SMITH, J. L. y LILLY H. D. (1971). *J. Appl. Bacteriol.* **34**, 133.
- ALLEY, G.; COURTS, D. y DEMEYER, D. (1992). *Meat Sci.* **32**, 279.
- ANDERSSON, R. E (1980). *J. Food Sci.* **45**, 1694.
- ANTEQUERA, T., LOPEZ-BOTE, C. J., CORDOBA, J. J., GARCIA, C., ASENSIO, M. A., VENTANAS, J., GARCIA-REGUEIRO, J. A. y DIAZ I. (1992). *Food Chem.* **45**, 105.
- A.O.A.C. (1990). En *Official Methods of Analysis*, 15th edn. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, p. 931.
- ASTIASARAN, I., LIZARRAGA, T. MELGAR, J., SANTAMARIA, I., VILLANUEVA, R. y BELLO, J. (1990). *Alimentaria enero-febrero*, 57.
- ASTIASARAN, I., REDIN, R., CID, C., IRIARTE, J. y BELLO, J. (1993). *Meat Sci.* **34**, 255.
- ASTON, J. W. y DOUGLAS, K. (1983b). *Aust. J. Dairy Technol.* **38**, 66.
- ASTON, J. W.; DURWARK, I. G.; FREDERICK, I. A. y DULLEY, J. R. (1983a). *New Zealand J. Dairy Sci. Technol.* **18**, 143.
- ASTON, J. W.; GILES, J. E.; DURWARK, I. G. y DULLEY, J. R. (1985). *J.*

*Dairy Res.* **52**, 565.

- AWAD, A.; POWRIE, W. D. y FENNEMA, O. (1968). *J. Food Sci.* **33**, 227.
- AYROULET, M. y FOURNAUD, J. (1976). *Fleischwirtsch.* **56**, 1331.
- BACUS, J. (1984). Update: meat fermentation 1984. *Food Technol.* **38**, 59.
- BACUS, J. N. (1986). Fermented meat and poultry products. En *Advances in Meat and Poultry Microbiology*. A. M. Pearson y T. R. Dutson (eds.). Macmillan, Londres, pp. 123.
- BACUS, J. N. y BROWN, W. L. (1981). Use of microbial cultures: meat products. *Food Technol.* **35**, 74.
- BAILEY, M. E. y SWAIN, J. W. (1973). Influence of nitrite in meat flavour. *Proc. Meat Ind. Res. Conf. American Meat Institute Foundation*, Chicago, pp. 29.
- BARBIERI, G., BOLZONI, L., PAROLARI, G., VIRGILI, R., BUTTINI, R., CARERI, M. y MANGIA, A. (1992). *J. Agric. Food Chem.* **40**, 2389.
- BAUMGARTNER, P. A.; KLETTNER, P. G. y RÖDEL, W. (1980). *Meat Sci.* **4**, 191
- BELFRAGE, P.; FREDRIKSON, G.; STRALFORS, P. y TORNQVIST, H. (1984). En *Lipases*. B. Borgstrom y H. L. Brockman (eds.). Elsevier, Amsterdam, pp. 364.
- BELITZ, H. D. y GROSCH, W. (1987). En *Food Chemistry*. Springer, Berlin, pp. 272.
- BERDAGUE, J. L.; BONNAUD, N.; ROUSSET, S. y TOURAILLE, C. (1991a). *Proc. 37th Int. Congr. Meat Sci. Technol.* Kulmbach, pp. 1135.
- BERDAGUE, J. L.; DENOYER, C.; LE QUERE, J. L. y SEMON, E. (1991b). *J. Agric. Food Chem.* **39**, 1257.

- BERDAGUE, J. L., MONTEL, C., TALON, R. y MONTEIL, P. (1992). *Proc. 38th Int. Congr. Meat Sci. Technol.*, Clermont-Ferrand, pp. 771.
- BERDAGUE, J. L., MONTEIL, P., MONTEL, M. C. y TALON, R. (1993). *Meat Sci.* **35**, 275.
- BERGER, R. G.; MACKU, C.; GERMAN, J. B. y SHIBAMOTO, T. (1990). *J. Food Sci.* **55**, 1239.
- BERIAIN, M. J., PEÑA, M. P. y BELLO, J. (1993). *Food Chem.* **48**, 31.
- BLIGH, E. G. y DYER, W. J. (1959). *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911.
- BLUMENTAL, H. J. (1972). En *The Staphylococci*. J. O. Cohen. (ed.). Willer, Nueva York, pp. 111.
- BOTHAST, R. J.; HELLY, R. F. y GRAHAM, P. P. (1973). *J. Food Sci.* **38**, 75.
- BOTTAZZI, V. (1965). *Scienza e Technica Lattiero-Casearia* **16**, 229-. Citada por Law (1984).
- BROCKERHOFF, H. (1966). *Comp. Biochem. Phys.* **19**, 1.
- BURCHARLES, C.; GIRARD, J. P.; SIRAMI, J. y PASCAL, G. (1984). *Sci. Aliments* **4**, 137.
- BURGOS, J. (1981). Factores tecnológicos que controlan la calidad de los embutidos crudos y maduros. *Filón* **diciembre**, 16
- BUTTERY, R.; HENDEL, G. C. y BOGGS, M. (1961). *Agr. Food. Chem.* **9**, 245.
- CAILLAT, J. y DRAPON, R. (1974). *Annal. Technol. Agric.* **23**, 273.
- CANTONI, C.; d'AUBERT, S.; BIANCHI, M. A. y GIANPAOLO, L. (1970). *Atti Soc. It. Sci.Vet.* **24**, 504.

- CANTONI, C.; MOLNAR, M. R.; RENON, P. y GIOLITTI, G. (1966). *Ind. Conserve* **41**, 188.
- CANTONI, C.; MOLNAR, R.; RENON, P. y GIOLITTI, G. (1967a). *Die Nahrung* **11**, 341.
- CANTONI, C.; MOLNAR, R.; RENON, P. y GIOLITTI, G. (1967b). *J. Appl. Bacteriol.* **30**, 190.
- CARERI, M.; MANGIA, A.; BARBIERI, G; BOLZONI, L.; VIRGILI, R. Y PAROLARI, G. (1992). *J. Food Sci.* en prensa.
- CASSENS, R. G.; GREASER, M. L.; ITO, T. y LEE, M. (1979). *Food Technol.* **33**, 46.
- CAVOSKI, D. D.; OBRADOVIC, D.; RADOVANOVIC, R.; PERUNOVIC, M. y FRIDL, T. (1988). *Proc. 34th Int. Congr. Meat Sci. Technol.*, Brisbane, pp. 368.
- CERISE, L., BRACCO, U., HORMAN, I., SOZZI, T. y WUHRMANN, J. J. (1973). *Fleischwirtsch.* **53**, 223.
- CESARI, E. P. (1919). En *La maturation du saucisson*. Academie des Sciences, París 168, 802.
- CESARI, E. P. y GUILLIERMOND, A. (1920). *Ann. Inst. Pasteur* **34**, 229.
- COLEMAN, M. H. y MACRAE, A. R. (1980). *U.K. Patent* 1 577 933/1980.
- COLLINS-THOMPSON, D. L. y RODRIGUEZ-LOPEZ (1981). *J. Food Prot.* **44**, 593.
- COMI, G. y CANTONI, C. (1980). *Ind. Aliment.* **19**, 857.
- CORDOBA, J. J. (1990). Tesis doctoral. Universidad de Extremadura. España.
- CORETTI, K. (1965). *Fleischwirtsch.* **45**, 21.

- CORETTI, K. (1977). *Fleischwirtsch.* **57**, 386.
- CRACKEL, R. L.; BUCKLEY, D. J.; ASHGAR, A.; GRAY, J. I. y BOORE, A. M. (1988). *J. Food Sci.* **53**, 1220.
- CROSS, C. K. y ZIEGLER, P. (1965). *J. Food Sci.* **30**, 610.
- CRYER, A. y JONES, H. M. (1979). *Comp. Biochem. Physiol.* **63B**, 501.
- CURRIE, R. W. y WOLFE, F. H. (1977). *Meat Sci.* **1**, 185.
- CHANG-HAN, K. y YEON-HEE, K. (1982). *Korean J. Anim. Sci.* **24**, 452.
- CHASCO, J., BERIAIN, M. J. y BELLO, J. (1992). *Alimentaria enero-febrero*, 33.
- CHASCO, J., BERIAIN, M. J. y BELLO, J. (1993). *Meat Sci.* **34**, 191.
- CHEAH, K. S. y CHEA, A. M. (1981). *Biochim. Biophys. Acta* **634**, 70.
- CHEAH, K. S.; CHEAH, A. M. y WARING, J. C. (1986). *Meat Sci.* **17**, 37.
- CHEFTEL, J. C. y CHEFTEL, H. (1980). En *Introducción a la Bioquímica de los Alimentos*. Volumen I. Editorial Acribia, Zaragoza, pp. 263.
- CHO, I. C. y BRATZLER, L. J. (1970). *J. Food Sci.* **35**, 668.
- CHRISTIANSEN, L. N.; TOMPKIN, R. B.; SHAPARIS, A. B.; JOHNSTON, R. W. y KAUTTER, D. A. (1975). *J. Food Sci.* **40**, 488.
- CHRISTIE, W. W. (1982). Structural analysis of lipids by means of enzymatic hidrolisis. En *Lipid Analysis*. Pergamon Press, Oxford, pp. 155.
- DAINTY, R. H.; SHAW, B. G.; HARDING, C. D. y MICHANIE, S. (1979). En *Cold Tolerant Microbes in Spoilage and the Environment*. A. D. Russell y R. Fuller (eds.). The Society for Applied Bacteriology technical series, nº 13. Academic Press Inc., Nueva York, pp. 83.

- DAINTY, R. H. y HIBBARD, C. M. (1980). *J. Appl. Bacteriol.* **48**, 387.
- DAINTY, R. H.; SHAW, B. G.; DE BOER, A. and SCHEPS, S. J. (1975). *J. Appl. Bacteriol.* **39**, 73.
- DALRYMPLE, R. H. y HAMM, R. (1975). *Z. Lebensmitt. Untersch. Forsch.* **158**, 333.
- DEBEVERE, J. M.; VOETS, J. P.; DE SCHRYVER, F. y HUYGHEBAERT, A. (1976). *Lebensm. Wiss. Technol.* **9**, 160.
- DECKER, E. A. y SCHANUS, E. G. (1986a). *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **63**, 101.
- DECKER, E. A. y SCHANUS, E. G. (1986b). *J. Agric. Food Chem.* **34**, 991.
- DEIBEL, R. H. y NIVEN, C. F. (1957). *Bacteriol. Proc.*, 14.
- DEKETELAERE, A.; DEMEYER, D.; VANDEKERCKHOVE, P. y VERVAEKE, I. (1974). *J. Food Sci.* **39**, 297.
- deMAN, J. M. (1992). En *Fatty Acids in Foods and their Health Implications*. Ch. K. Chow (ed.). Marcel Dekker Inc., New York, pp. 17.
- DEMEYER, D. I. (1982). *Antoine van Leeuwenhoek* **48**, 414.
- DEMEYER, D. I. y VERPLAETSE, A. (1985). *J. Sci. Food Agric.* **36**, 1345.
- DEMEYER, D. I.; VANDEKERCKHOVE, P. y MOERMANS, R. (1979). *Meat Sci.*, 161.
- DEMEYER, D. I.; VERPLAETSE, A. y GISTELINK, M. (1987). *Proc. 33rd Int. Congr. Meat Sci. Technol.* Helsinki, pp. 241.
- DEMEYER, D., HOOZEE, J. y MESDOM, H. (1974). *J. Food Sci.* **39**, 293.
- DESNUELLE, P. (1972). En *The Enzymes*. P. D. Boyer (ed.). Academic

Press, Nueva York, 3, pp. 575.

DETHMERS, A. E.; ROCK, H. FAZIO, T. Y JOHNSTON, R. W. (1975). *J. Food Sci.* **40**, 491.

DIAZ, O., FERNANDEZ, M., GARCIA DE FERNANDO, G. D., HOZ, L. y ORDOÑEZ, J. A. (1993). *Meat Sci.* **34**, 205.

DIERICK, N.; VANDEKERCKHOVE, P. V. y DEMEYER, D. I. (1974). *J. Food Sci.* **39**, 301.

DIMICK, P. S. y MACNEIL, J. H. (1970). *J. Food Sci.* **35**, 186.

DIMICK, P. S.; MACNEIL, J. H. y GRUNDEN, L. P. (1972). *J. Food Sci.* **37**, 544.

DOBBERTIN, S.; SIEMS, H. y SINELL, H. J. (1975). *Fleischwirtsch.* **55**, 237.

DOMINGUEZ, M. C. (1988). Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de León. España.

DOMINGUEZ, M. C., GUTIERREZ, L. M., LOPEZ, A., SECO, F. Y ZUMALACARREGUI, J. M. (1989). *Alimentaria* **199**, 11.

DOMINGUEZ, M. C.; FERRE, C. y ZUMALACARREGUI, J. M. (1988). *Alimentaria* **diciembre 88**, 19.

DOMINGUEZ M. C. y ZUMALACARREGUI, J. M. (1991). *Meat Sci.* **29**, 99.

DRAPON, R. (1972). *Annal. Technol. Agric.* **21**, 467.

DUDZINSKI, A. E. (1967). *J. Chromatogr.* **31**, 560.

DWIVEDI, B. K. (1975). *CRC Crit. Rev. Food Technol.* **5**, 487.

EILBERG, B. L. y LIEPE, H. U. (1977). *Fleischwirtsch.* **57**, 1678.

- EL SALIM, A. M. H.; EL SHIBINY, S.; EL BAGOURY, E.; AYAD, E. y FAHMY, N. (1978). *J. Dairy Res.* **45**, 491.
- EL-NESHEWY, A. A.; BAKY, A. A. y FARAHAT, S. M. (1983). *Food Chem.* **10**, 121.
- EL-NESHEWY, A. A.; RABIE, A. M.; BAKY, A. A.; EMARA, E. A. y NASR, M. M. (1984). *Food Chem.* **14**, 201.
- EVERSON, C. W.; DANNER, W. E. y HAMMES, P. A. (1970). *J. Agric. Food Chem.* **18**, 570.
- FARKAS, J.; INCZE, K.; ANDRASSY, E. y REICHARDT, J. (1988). *Biotechnol. Food Ind. Proc. Int. Symp.* Budapest, 479.
- FAURE, M. (1954). En *Techniques de Laboratoire. Cap. IV: Lipides et Substances Lipidiques* (J. Loisseleur ed.). Masson et Cie, Paris.
- FERREIRA, G. C. y PATTON, J. S. (1990). *J. Lipid Res.* **31**, 889.
- FERRER, J. y ARBOIX, P. (1986a). *Proc. 32nd Eur. Meet. Meat Res. Work.* Gante, pp. 277.
- FERRER, J. y ARBOIX, P. (1986b). *Proc. 32nd Eur. Meet. Meat Res. Work.* Gante, pp. 279.
- FISCHER, K. y AUGUSTINI, C. (1977). *Fleischwirtsch.* **57**, 1191.
- FOOLADI, M. H.; PEARSON, A. M.; COLEMAN, T. H. y MERKET, R. A. (1979). *Food Chem.* **4**, 284.
- FORSS, D. A. (1972). En *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids*, Vol 13. R. T. Holman (ed.). Pergamon Press, Oxford, pp. 177.
- FORSS, D. A. (1979). *J. Dairy Res.* **46**, 691.
- FRANKEL, E. N. (1982). *Progr. Lipid Res.* **22**, 1.

- FRANKEL, E. N. (1991). *J. Sci. Food Agric.* **54**, 495.
- FRANKEL, E. N.; NEFF, W. E. y MIYASHITA, K. (1990). *Lipids* **25**, 40.
- FRANSON, R.; WAITE, M. y WEGLIICKI, W. B. (1972). *Biochemistry* **11**, 472.
- FREY, W. (1985). En *Fabricación fiable de embutidos*. Editorial Acribia, Zaragoza, pp. 1.
- FROEHLICH, D. A.; GULLET, E. A. y USBORNE, W. R. (1983). *J. Food Sci.* **48**, 152.
- FRUTOS, M.; SANZ, J. y MARTINEZ-CASTRO, I. (1991). *J. Agric. Food Chem.* **39**, 524.
- GADZHEVA, D.; VERGIEVA, V. y NESTOROV, N. (1982). *Proc. 28th Eur. Meet. Meat Res. Work.*, pp. 227.
- GARCIA, C.; BERDAGUE, J. J.; ANTEQUERA, T; LOPEZ-BOTE, C.; CORDOBA, J. J. y VENTANAS, J. (1991). *Food Chem.* **41**, 23.
- GARCIA, M. L., SELGAS, M. D., FERNANDEZ, M. y ORDOÑEZ, J. A. (1992). *Int. J. Food Sci. Technol.* **27**, 675.
- GARVIE, E. (1984). En *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*. F. L. Davies y B. A. Law (eds.). Elsevier Applied Science Publishers, Londres, pp. 35.
- GATFIELD, I. L. (1988). *Food Technol.* **42**, 110.
- GENIGEORGIS, C.; WILSON, B.; FANELLI, M.S. y METAXOPOULOS, J. (1986). *Proc. 32nd Eur. Meet. Meat Res. Work.* Gante, pp. 267.
- GERVASINI, C. y CASERIO, G. (1969). *Wien. Tierärztl. Mschr.* **56**, 418.
- GEYER, K. G. y GOODMAN, H. M. (1970). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **133**, 404.

- GILL, C. O. (1982). Microbial interactions with meats. En *Meat Microbiology*. M.H. Brown (ed.). Applied Science Publishers, London, pp. 225.
- GIOLITTI, C.; CANTONI, C.; BIANCHI, M. A.; RENON, P. y BERETTA, G. (1971). *Arch. Vet. It.* **22**, 61.
- GÖKALP, H. Y. (1986). *J. Food Technol.* **21**, 615.
- GORBATOV, V. M. y LIASKOWSKAYA, Y. N. (1980). *Meat Sci.* **4**, 209.
- GOTTSCHALK, G. (1979). En *Bacterial metabolism*. Springer-Verlag, Nueva York, pp. 173.
- GOTZ, F.; KREUTZ, B. y SCHLEIFER, K. (1983). *Mol. Gen. Genet.* **189**, 340.
- GOUSSAULT, B. y GIRARD, J. P. (1976). *L'Alimentation et la Vie* **64**, 109.
- GOVINDARAJAN, S.; HULTIN, H. O. y KOTULA, A. W. (1977). *J. Food Sci.* **42**, 571.
- GRANER, M.; FONSECA, H. y BASSO, L. C. (1983). *Cienc. Tecnol. Aliment.* **3**, 48.
- GRAU, F. H. (1981). *Appl. Env. Microbiol.* **42**, 1043.
- GRECO, J. (1991). *Enzyme Microbiol. Technol.* **13**, 353.
- GREENE, B. E.; y PRICE, L. G. (1975). *J. Agr. Food Chem.* **23**, 164.
- GRIEVE, P.A y DULLEY, J. R. (1983). *Aust. J. Dairy Technol.* **38**, 49-54.
- GRIGOR, M. R.; MOEHL, A. y SNYDER, F. (1972). *Lipids* **7**, 766.
- GROSCH, W. (1987). En *Autoxidation of Unsaturated Lipids*. H. W. S. Chan (ed.). Academic Press, Londres, pp. 95.

- GROSCH, W. (1988). *Lebensm. Wiss-u Technol.* **21**, 261.
- GUARDIA, E. J. y HASS, G. J. (1967). *J. Agric. Food Chem.* **15**, 412.
- GUERRERO, L. (1993). *Eurocarne* **9**, 23.
- HADDEN, J. P.; OCKERMAN, H. W.; CAHILL, J. R.; PARRETT, N. A. y BARTON, R. J. (1975). *J. Food Sci.* **40**, 626.
- HALVARSON, H. (1973). *J. Food Sci.* **38**, 310.
- HAMILTON, R. J. (1989). En *Rancidity in Foods*. J. C. Allen y R. J. Hamilton (eds.). Elsevier Applied Science Publishers, Londres, pp. 1.
- HAMMER, G. F. (1977). *Fleischwirtsch.* **57**, 1957.
- HANSON, S. W. F. and OLLEY, J. (1963). *Biochem. J.* **89**, 101P.
- HAREL, S. y KANNER, J. (1985). *J. Agric. Food Chem.* **33**, 1186.
- HARRIS, N. D. y LINDSAY, R. C. (1972). *J. Food Sci.* **37**, 19.
- HECHELMANN, H. y KASPROWIAK, R. (1991). *Fleischwirtsch.* **71**, 1303.
- HECHELMANN, H.; HOLZAPFEL, W. y BEM, Z. (1977). *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung*, Kulmbach, part **55**, 2963.
- HENDERSON, S. K.; WITCHWOOT, A. y NAWAR, V. W. (1980). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **57**, 409.
- HILDITCH, T. P. y WILLIAMS, P. N. (1964). En *Chemical Constitution of Natural Fats*. Chapman & Hall, Londres, 4th Ed.
- HO, Ch. (1980). *Proc. Meat Ind. Res. Conf.*, 41.
- HOFFMAN, K. (1988). *Fleischwirtsch. español* **1**, 13.
- HORNSTEIN, I. y CROWE, P. F. (1964). *J. Agric. Food Chem.* **11**, 336.

- HORNSTEIN, R. T.; CROWE, P. F. y HEIMBERG, M. J. (1961). *J. Food Sci.* **26**, 581.
- HUERTAS, M. C. (1990). Tesis doctoral. Facultad de Biología. Universidad de León. España.
- IGENE, J. O. y PEARSON, A. M. (1979). *J. Food Sci.* **44**, 1285.
- IGENE, J. O.; PEARSON, A. M.; DUGAN, L. R. y PRICE, J. F. (1980). *Food Chem.* **5**, 262.
- INCZE, K. (1987). *Fleischwirtsch.* **67**, 445.
- INCZE, K. (1992). *Fleischwirtsch.* **72**, 58.
- INGRAM, M. (1974). En *International Symposium on Nitrite in Meat Products*. B. Krol y B. J. Tinbergen (eds.). Pudoc, Wageningen, The Netherlands, pp. 63.
- IWASAKI, T. y KOSIKOWSKI, F. V. (1973). *J. Dairy Sci.* **56**, 623.
- JENSEN, L. B. y PADDOCK, L. S. (1940). Sausage treatment. *U.S. Pat.* 2225783.
- JOLLY, R. C. y KOSIKOWSKI, F. V. (1975). *J. Agric. Food Chem.* **23**, 1175.
- KANDLER, O. (1983). *Antoine van Leeuwenhoek* **49**, 209.
- KANNER, J y HAREL, S. (1985). *Arch. Biochem. Biophys.* **237**, 314.
- KATO, T.; KANIE, K.; SHIGA, I. y SATO, T. (1985). *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **59**, 11.
- KATSARAS, K. y LEISTNER, L. (1988). *Fleischwirtsch.* **68**, 1295.
- KEENEY, M. (1962). Secondary degradation products in lipids and their

oxidation. H. W. Schultz, E. A. Day y R. O. Sinnhuber (eds.). AVI Publishing Comp. Westport, Connecticut, pp.

KELLER, J. E.; SKELLEY, G. C. y ACTON, J. C. (1974). *J. Food Prot.* **37**, 101.

KHAYAT, A. y SCHWALL, D. (1983). *Food Technol.* **37**, 130.

KILARA, A. (1985). *Proc. Biochem.* **20**,35.

KINSELLA, S. E. y HWANG, D. (1976). *Biotechnol. Bioeng.* **18**, 927.

KLEMENT, J. T.; CASSENS, R. G. y FENNEMA, O. R. (1973). *J. Food Sci.* **38**, 1128.

KLEMENT, J. T.; CASSENS, R. G. y FENNEMA, O. R. (1974). *J. Food Sci.* **39**, 833.

KLETTNER, P. G. y LIST, D. (1980). *Fleischwirtsch.* **60**, 1589.

KLETTNER, P. G. y RÖDEL, W. (1978). *Fleischwirtsch.* **58**, 57.

KLETTNER, P. G. y RÖDEL, W. (1980). *Fleischerei* **31**, 1101.

KRISTJANSSON, M. M. y KINSELLA, J. E. (1991). *Adv. Food Nutr. Res.* **35**, 237.

KRISTOFFERSEN, T.; MIKOLAJCIK, E. M. y GOULD, I. A. (1967). *J. Dairy Sci.* **50**, 292.

KUCHLING, E. (1965). *Proc. 11th Conf. Eur. Meat Meet. Res. Work.*, Belgrado, I/11.

KWOH, T. L. (1971). *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **48**, 550.

LABUZA, T. P. (1971). *CRC Crit. Rev. Food Technol.* **2**, 355.

LABUZA, T. P.; ACOTT, K., TATINI, S. R. and LEE, R. Y. (1976). *J. Food*

*Sci.* **41**, 910.

LADIKOS , D. y LOUGOVOIS, V. (1990). *Food Chem.* **35**, 295.

LANDVOGT, A. y FISCHER, A. (1991). *Fleischwirtsch.* **71**, 902.

LANGNER, H. J. (1972). *Fleischwirtsch.* **52**, 1299.

LANGNER, H. J.: HECKEL, U. y MALEK, E. (1970). *Fleischwirtsch.* **50**, 1193.

LAW, B. A. (1984). En *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*. F. L. Davies y B. A. Law (eds.). Elsevier Applied Science Publishers, Londres, pp. 209.

LAW, B. A. (1991). *Bull. I. D. F.* **261**, 3.

LAW, B. A. y WIGMORE, A. S. (1982a). *J. Dairy Res.* **49**, 137.

LAW, B. A. y WIGMORE, A. S. (1982b). *J. Soc. Dairy Technol.* **35**, 75.

LAW, B. A. y WIGMORE, A. S. (1983). *J. Dairy Res.* **50**, 519.

LAW, B. A.; HOSKING, Z. D y CHAPMAN, H. R. (1979). *J. Soc. Dairy Technol.* **32**, 87.

LEE, S.K. (1987). *Korean Journal of Animal Science* **29**, 130.

LEISTNER, L. y BEM, Z. (1970). *Fleischwirtsch.* **50**, 350.

LEISTNER, L. y ECKARDT, C. (1979). *Fleischwirtsch.* **59**, 1892.

LEON CRESPO, F. y MILLAN, R. (1977). *Archivos de Zootecnia* **26**, 103.

LEON CRESPO, F.; BARRANCO, A.; PENEDO, J. C.; BELTRAN DE HEREDIA, F.; MATA, C; MONTERO, E. y MARTINS, C. (1985). *Alimentaria* **163**, 51.

- LEON-CRESPO, L.; MILLAN, R. y SERRANO MORENO, A. (1978). *Alimentaria* **98**, 29.
- LIEPE, H. U. (1982). En *Biotechnolgy*. H. J. Rehm y G. Reed (eds.). Verlag Chemie, Basel, vol. 5, pp. 400.
- LIN K. W.; KEETON, J. T.; GRAIG, T. M.; GATES, C. E.; GAMBLE, H. R.; CUSTER. C. S. y CROSS, H. R. (1990a). *J. Food Sci.* **55**, 285.
- LIN K. W.; KEETON, J. T.; GRAIG, T. M.; HUEY, R. H.; LONGNECKER, M. T.; GAMBLE, H. R.; CUSTER. C. S. y CROSS, H. R. (1990b). *J. Food Sci.* **55**, 289.
- LIST, D. y KLETTNER, P. G. (1978). *Fleischwirtsch.* **58**, 136.
- LIU, H. P. (1970a). *J. Food Sci.* **35**, 590.
- LIU, H. P. (1970b). *J. Food Sci.* **35**, 593.
- LIU, H. P. y WATTS, B. M. (1970). *J. Food Sci.* **35**, 596.
- LIZARRAGA, T., MELGAR, J. y BELLO, J. (1989). *Grasas y Aceites* **40**, 370.
- LOIS, A. L., GUTIERREZ, L. M., ZUMALACARREGUI, J. M. Y LOPEZ, A. (1987). *Meat Sci.* **19**, 169.
- LOPEZ-BOTE, C.; ANTEQUERA, T.; CORDOBA, J. J.; GARCIA, C.; ASENSIO, M. A. y VENTANAS, J. (1990). *Proc. 36th Int. Congr. Meat Sci. Technol.* La Habana, pp. 883.
- LOPEZ. M. O., HOZ, L., CAMBERO M. I., GALLARDO, E., REGLERO, G. y ORDOÑEZ, J. A. (1992). *Meat Sci.* **31**, 267.
- LÖTZSCH, R. y RÖDEL, W. (1978). *Fleischwirtsch.* **54**, 1203.
- LOURY, M. (1972). *Lipids* **7**, 671.

- LOWRY, R. R. (1968). *J. Lipid Res.* **9**, 397.
- LUBIENICKI V. SCHELHORN, (1972). *Fleischwirtsch.* **52**, 72.
- LÜCKE, F. K. (1984). En *Microbiology of Food Fermentation*. B. J. B. Wood (ed.). Applied Science Publishers, Londres, vol. 2, pp. 41.
- LÜCKE, F. K. (1985). *J. Sci. Food Agric.* **36**, 1342.
- LÜCKE, F. K. (1986). *Fleischwirtsch.* **66**, 1505.
- LUO, S. W. y HULTIN, H. O. (1986). *46th Ann. Meeting Inst. of Food Technologists*. Dallas, Texas. Abstr. 438.
- MAARSE, H. y BELZ, R. (1981). En *Isolation, Separation and Identification of Volatile Compounds in Aroma Research*. Akademie-Verlag, Berlín .
- MABROUK, A. F. (1976). *ACS Symp Series* nº 26. I. Katz (ed.). American Chemical Society, Washington D. C., pp. 146.
- MACDONALD, B. GRAY, J. I. y GIBBINS, L. N. (1980b). *J. Food Sci.* **45**, 893.
- MACDONALD, B. GRAY, J. I.; KAKUDA, Y. y LEE, M.L. (1980a). *J. Food Sci.* **45**, 889.
- MACDOUGALL, D. B.; MOTTRAM, D. S. Y RHODES, D. N. (1975). *J. Sci. Food Agric.* **26**, 1734.
- MACRAE, A. R. (1983). En *Microbial Enzymes and Biotechnology*. W. H. Fogarty (ed.). Applied Science Publishers, Nueva York, pp. 225.
- MARTINEZ, E. J.; BORINO, N. y ALZAMORA, M. S. (1986). *Food Microbiol.* **3**, 321.
- MASANA, M. O. y LASTA, J. A. (1992). *Proc. 38th Int. Congr. Meat Sci. Technol.* Clermont-Ferrand, pp. 679.

- MAXWELL, R. J. y MARMER, W. N. (1983). *Lipids* **18**, 453.
- MCMEEKIN, T. A. (1982). En *Developments in Food Microbiology*. I. R. Davies (ed.). Applied Science Publishers, London, pp. 1.
- MELGAR, M. J., SANCHEZ-MONJE, J. M. y BELLO, J. (1989). *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* **29**, 199.
- MELGAR, M. J., BERIAIN, M. J., y BELLO, J. (1990). *Rev. Agroquím. Tecnol. Alim.* **30**, 3631.
- MELO, R. S.; PALMINHA, M.; CRUZ, I. V. y MORGADO, R. (1986). *Proc. 32nd Eur. Meet. Meat Res. Work.*, Gante, pp. 217.
- MENDIOLEA, R.; LEDWARD, D. y LAWRIE, R. A. (1990). *Proc. 36th Int. Congr. Meat Sci. Technol.* La Habana, pp. 896.
- MENDOZA, S.; FLORES, J. y SILLA, H. (1983). *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* **23**, 86.
- MERCK (1983). En *The Merck Index*, 10th ed. M. Windholz y S. Budavari (eds.). Merck and Co. Inc., Rahway, N.J.
- METAXOPOULOS, J.; GENIGEORGIS, C.; FANELLI, M. J.; FRANTI, C. y COSMA, E. (1981a). *J. Food Prot.* **44**, 347.
- METAXOPOULOS, J.; GENIGEORGIS, C.; FANELLI, M. J.; FRANTI, C. y COSMA, E. (1981b). *Appl. Env. Microbiol.* **42**, 863.
- MIHALYI, V. y KORMENDY, L. (1967). *Food Technol.* **21**, 1398.
- MIN, D. B. S.; INA, K.; PETERSON, R. J. y CHANG, S. S. (1979). *J. Food Sci.* **44**, 639.
- MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO (1986). *B.O.E.* 22-1-1986.
- MISOCK, J. P.; KUNSMAN, J. E. y FIELD, R. A. (1979). *J. Food Sci.* **44**, 151.

- MOERCK, K. E. y HERSCHELL, R. B. (1979). *J. Agric. Food Chem.* **27**, 514.
- MONTEL, M. C.; TALON, R.; BERDAGUE, J. L. y CANTONNET, M. (1993). *Meat Sci.* **35**, 229.
- MOODY, W. G. (1983). *Food Technol.* **37**, 227.
- MORRISON, R. T. y BOYD, R.N. (1985). En *Química Orgánica*. Fondo Educativo Interamericano, pp. 732.
- MOSKOWITZ, G. J. (1980). En *The Analysis and Control of Less Desirable Flavours in Food and Beverages*. G. Charalambous (ed.). Academic Press, Nueva York, pp. 53.
- MOTILVA, M. J. (1992). Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. España.
- MOTTRAM, D. S., CROFT, S. E. y PATTERSON, R. L. S. (1984). *J. Sci. Food Agric.* **35**, 233.
- MULTON, J. L. y BIZOT, M. (1977). En *Aliments à humidité intermédiaire et détermination de l'activité de l'eau*. 3er Symposium International. Alimentation et Travail.
- NAES, H., PEDERSEN, B. O., HOLCK, A. L., AXELSSON, L. , HOLTEN, V. y BLOM, H. (1992). *Proc. 38th Int. Congr. Meat Sci.Technol.*, Clermont-Ferrand, pp. 815.
- NAGY, A.; MIHALYI, V. e INCZE, K. (1989). *Fleischwirtsch.* **69**, 5878.
- NAWAR, W. W. (1989). En *Thermal Generation of Aromas*. T. H. Parliment, R. J. McGorin y C. -T. Ho (eds.). ACS Symposium Series 409. American Chemical Society, Washington D. C., pp. 94.
- NEER, K. L. y MANDIGO, R. W. (1977). *J. Food Sci.* **42**, 738.
- NEFF, W. E.; FRANKEL, E. N. y MIYASHITA, K. (1990). *Lipids* **25**, 33.

- NES, I. E. y SKJELKVALE, R. (1982). *J. Food Sci.* **47**, 1618.
- NES, I. F.; SKJELKVALE, R.; OLSVIK, B. y BERDAL, B. P. (1984). En *Microbial Asociations and Interactions in Food*. I. Kiss, T. Deák y K. Incze (eds.). Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 435.
- NIELSEN, H. J. S. y KEMNER, M. K. B. (1989). *Proc. 35th Int. Congr. Meat Sci. Technol.* Copenhagen, pp. 318.
- NIETO, P.; MOLINA, I.; FLORES, J. y BERMELL, S. (1989). *Proc. 35th Int. Congr. Meat Sci. Technol.* Copenhagen, pp. 323.
- NIINIVAARA, F. P. (1955). Tesis doctoral. Universidad de Helsinki. *Acta Agricola Fennica* **85**, 1.
- NIINIVAARA, F. P.; POHJA, M. S. y KOMULAINEN, S. E. (1964). *Food Technol.* **18**, 25.
- NUMATA, M.; FUKE, T.; HASHIMOTO, S. y NAKAMURA, T. (1988a). *Japanese Journal of Zootechnological Science* **59**, 12.
- NUMATA, M.; FUKE, T.; SUITANI, Y.; HASHIMOTO, S.; YAMADA, N. y NAKAMURA, T. (1988b). *Japanese Journal of Zootechnological Science* **59**, 136.
- NURMI, E. (1966). *Acta Agralia Fennica* **108**, 1.
- NURMI, E. y NIINIVAARA, F. P. (1964). *Proc. 10th Eur. Meet Meat Res. Work.* Roskilde, G 8.
- NYCHAS, G. J. E. y ARKOUELOS, J. S. (1990). Staphylococci: their role in fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.*, 167S-188S.
- O'KEEFE, A. M.; MULHOLLAND, E. D. y PHELAN, J. A. (1980). *Irish J. Food Sci. Technol.* **4**, 75.
- O'KEEFE, A. M.; MULHOLLAND, E. D.; KIELY, N.; O'BRIEN, M. F. y PHELAN, J. A. (1979). *Irish J. Food Sci. Technol.* **3**, 74.

- OCKERMAN, A. W. y KUO, J. C. (1982). *J. Food Sci.* **47**, 16311.
- OCKERMAN, H. W. y LEON-CRESPO, F.(1981). *J Food Sci.* **46**, 1944.
- OCKERMAN, H. W.; BLUMER, T. N. y CRAIG, H. B. (1964). *J. Food Sci.* **29**, 123.
- OHLOFF, G. y FLAMENT, I. (1978). *Heterocycles* **11**, 663.
- OLSEN, L. F. (1985). *J. Sci. Food Agric.* **36**, 1344.
- OMOLOSHO, D. y GIRARD, J. P. (1983). *V.P.C.* **4**, 1271.
- ORDOÑEZ, J. A., ASENSIO, M. A., GARCIA, M. L., SELGAS, M. D. y SANZ, B. (1989). *Fleischwirtsch.* **69**, 1023.
- ORDOÑEZ, J. A.; HOZ, L.; HIERRO, E. y CAMBERO, M. I. (1993). *Eurocarne* **18**, 15.
- OWEN, J. E.; LAWRIE, R. A. y HARDY, B. (1975). *J. Sci. Food Agric.* **26**, 31.
- PALEARI BIANCHI, M. A., BERETTA, G., CATTANEO, P. y BALZARETTI, C. (1985). *Ind. Aliment.* **4**, 371.
- PALUMBO, S. A. y SMITH, J. L. (1977). En *Enzymes in Food and Beverage Processing*. L. Ory y J. St. Angelo (eds.). ACS Symposium Series, nº 47, pp. 279.
- PALUMBO, S. A.; ZAIKA, L. L.; KISSINGER, J. C. y SMITH, J. L. (1976). *J. Food Sci.* **41**, 127.
- PAREJO, I.; ORDOÑEZ, J. A.; GARCIA, M.L. y LOPEZ LORENZO, P. (1979). *VII Congreso Nacional de Microbiología (S.E.M.)*. Cádiz. Comunicación 314.
- PEARSON, A. M.; LOVE, J. D. y SHORLAND, F. B. (1977). *Adv. Food Res.* **23**, 14.

- PEDERSON, C. S. (1980). En *Microbiology of food fermentations*, Westport, Conn. AVI Publishing Co.
- PEERSON, T. y VON SYDOW, C. (1973). *J. Food Sci.* **38**, 377.
- PETÄJÄ, E. (1977a). Tesis doctoral. Universidad de Helsinki.
- PETÄJÄ, E. (1977b). *Fleischwirtsch.* **57**, 109.
- PETÄJÄ, E. (1980). *Proc. 26th Eur. Meet Meat Res. Work.* Colorado Springs, pp. 260.
- PETERSON, R. J. y CHANG, S. S. (1982). *J. Food Sci.* **47**, 1444.
- PEZACKI, W. y PEZACKA, E. (1987). *Acta Alimentaria Polonica* **13**, 33.
- PFEIL, E. y LIEPE, H.-U. (1974). *Fleischwirtsch.* **54**, 1717.
- PIOTROWSKI, E. G.; ZAIKA, L. L. y WASSERMAN, A. E. (1970). *J. Food Sci.*, **35**, 321.
- PIPPEN, E. L.; NONAKA, M.; JONES, F. T. y STILL, F. (1958). *Food Res.* **23**, 103.
- PRESIDENCIA DEL GOBIERNO (1980). *B.O.E.* 21-3-1980.
- PRICE, L. G. y GREENE, B. E. (1978). *J. Food Sci.* **43**, 319.
- PUOLANNE, E. (1982). *35th Ann Recip. Meat Conf. Amer. Meat Sci. Assoc.*, Blacksburg, Va., p. 49.
- PYRCZ, J. y PEZACKI, W. (1981). *Fleischwirtsch.* **61**, 446.
- RACHEV, R. y PANOVA, V. (1980). *Nauchni Trudove, Institut po Mlechna Promishlenost* **11**, 69.
- RADOVANOVIC, R.; CAVOSKI, D.; VALIKOVIC, D. y CARAPIC, G. (1990). *Proc. 36th Int. Congr. Meat Sci. Technol.* La Habana, pp. 905.

- RAMASWAMY, H. S. y RICHARDS, J. F. (1982). *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* **15**, 7.
- REINDL, B. y STAN, H. J. (1982). *J. Agric. Food Chem.* **30**, 849.
- RHEE, K. S. (1988). *Food Technol.* **42**, 127.
- RHEE, K. S. (1992). En *Fatty Acids in Foods and their Health Implications*. Ch. K. Chow (ed.). Marcel Dekker Inc., Nueva York, pp. 65.
- RHEE, K. S. y ZIPRIN, Y. A. (1987). *J. Food Biochem.* **11**, 1.
- RHEE, K. S.; DUTSON, T. R. y SAVELL, J. W. (1984). *J. Food Biochem.* **9**, 27.
- RHEE, K. S.; DUTSON, T. R. y SMITH, G. C. (1984). *J. Food Sci.* **49**, 675.
- RHEE, K. S.; SEIDEMAN, S. C. y CROSS, H. R. (1986). *J. Agric. Food Chem.* **34**, 308.
- RHEE, K. S.; SMITH, G. C. y RHEE, K.C. (1983a). *J. Food Sci.* **48**, 351.
- RHEE, K. S.; SMITH, G. C. y TERRELL, R. N. (1983b). *J. Food Prot.* **46**, 578.
- RHEE, K. S.; ZIPRIN, Y. A. y ORDOÑEZ, G. (1987). *J. Agric. Food Chem.* **35**, 1013.
- RÖDEL, W. y STIEBING, A. (1989). *Fleischwirtsch. español*, 38-48.
- ROZIER, J. (1969). *Rec. Med. Vet.* **145**, 1069.
- SALEH, B. y WATTS, B. M. (1968). *J. Food Sci.* **33**, 353.
- SALIH, A. M., PRICE, J. F. , SMITH, D. M. y DAWSON, L. E. (1988). *J. Food Sci.* **53**, 654.
- SAMELIS, J., AGGELIS, G. Y METAXOPOULOS, J. (1993). *Meat Sci.* **35**,

371.

- SANDERSON, A.; PEARSON, A. M. y SCHWEIGERT, B. S. (1966). *J. Agric. Food Chem.* **14**, 245.
- SANZ, B.; SELGAS, D.; PAREJO, I. y ORDOÑEZ, J. A. (1988). *Int. J. Food Microbiol.* **6**, 199.
- SARRA, P. G.; CABRAS, M. y DELLAGLIO, F. (1982). *Ind. Aliment.* **21**, 477.
- SATO, K. y HEGARTY, G. R. (1971). *J. Food Sci.* **36**, 1098.
- SCHIEBERLE, P. y GROSCH, W. J. (1981). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58**.
- SCHLENK, L. y GELLERMAN, J. L. (1960). *Anal. Chem.* **32**, 1412.
- SEBRANEK, J. G. y FOX, J. B. (1985). *J. Sci. Food Agric.* **36**, 1169.
- SELGAS, M. D. (1985). Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense. Madrid. España.
- SELGAS, M. D.; SANZ, B. y ORDOÑEZ, J. A. (1986). *Proc. 32nd Eur. Meet. Meat. Res. Work.* Gante, pp. 251.
- SELGAS, M. D.; SANZ, B. y ORDOÑEZ, J. A. (1988). *Food Microbiol.* **5**, 185.
- SELKE, E.; ROHWEDDER, W. K. y DUTTON, H. J. (1980). *J. Am. Oil Chem Soc.* **57**, 75.
- SERRANO MORENO, A. (1979). *Alimentaria* **39**, 101.
- SHAHANI, K. M.; ARNOLD, R. G.; KILARA, A. y DWIVEDI, B. K. (1976). *Biotechnol. Bioeng.* **18**, 891.
- SHAHIDI, F., RUBIN, L. J. y D'SOUZA, L. A. (1986). *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **24**, 141.

- SHAHIDI, F.; YUN, J.; RUBIN, L. J. y WOOD, D. F. (1987). *Can. Inst. Food Sci. Technol.* **20**, 104.
- SHAW, N. (1968). *Biochim. Biophys. Acta* **164**, 435.
- SIMON, S.; ELLIS, D. E.; MACDONALD, B. D.; MILLER, D. G.; WALDMAN, R. C. y WESTERBERG, D. O. (1973). *J. Food Sci.* **38**, 919.
- SINK, J. (1979). *J. Food Sci.* **44**, 1.
- SKELLEY, G. C.; KEMP, J. D. y VARNEY, W. Y. (1964). *J. Anim. Sci.* **23**, 633.
- SKJELKVALE, R.; TJABERG, T. B. y VALLAND, M. (1974). *J. Food Sci.* **39**, 520.
- SKLAN, D.; TENNE, Z. y BUDOWSKI, P. (1983). *J. Sci. Food Agric.* **34**, 93.
- SMITH, J. L. y ALFORD, J. A. (1969). *J. Food Sci.* **34**, 75.
- SOOD, V. K. y KOSIKOWSKI, F. V. (1979a). *J. Dairy Sci.* **62**, 1865.
- SOOD, V. K. y KOSIKOWSKI, F. V. (1979b). *Food Sci.* **44**, 1690.
- STADHOUDERS, J. (1974). *Milchwissensch.* **29**, 329.
- STADHOUDERS, J. y VERINGA, H. A. (1973). *Neth. Milk Dairy J.* **27**, 77.
- STAHNKE, L. y ZEUTHEN, P. (1992). *Proc. 38th Int. Congr. Meat Sci. Technol.*, Clermont-Ferrand, pp. 835.
- STANCULESCU, C.; SANDULESCU, C. y SBIRCEA, C. (1970). *Proc. 16th Eur. Meet. Meat Res. Work.* Varna, pp.1042.
- STIEBING, A. y RÖDEL, W. (1988). *Fleischwirtsch. español* , 30.

- STIEBING, A. y RÖDEL, W. (1990). *Fleischwirtsch.* **70**, 1039.
- STRATERS, K. C. y WINCKLER, K. C. (1963). *J. Gen. Microbiol.* **33**, 213.
- SUGIURA, M. e ISOBE, M. (1975). *Chem. Pharm. Bull. (Japan)* **23**, 281.
- SWERN, D. (1964). En *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. D. Swern (ed.). Interscience, Nueva York, pp. 55.
- TALON, R.; MONTEL, M. C. y CANTONNET, M. (1992). *Proc. 38th Int. Congr. Meat Sci. Technol.*, Clermont-Ferrand, pp. 843.
- TETLOW, A. L. y HOOVER, D. G. (1988). *J. Food Prot.* **51**, 804.
- THOMAS, T. D.; TURNER, K. W. y CROW, V. L. (1980). *J. Bacteriol.* **144**, 672.
- THORNILL, P. J. y COGAN, T. M. (1984). *Appl. Env. Microbiol.* **47**, 1250.
- TICHIVANGANA, J. Z. y MORRISEY, P. A. (1985). *Meat Sci.* **15**, 107.
- TOCHER, D. R.; WEBSTER, A. y SARGENT, J. R. (1986). *Biotechnol. Appl. Biochem.* **8**, 83.
- TOMBS, M. B. (1985). *J. Appl Biochem.* **7**, 3.
- TOMITA, Y.; NAGAYAMA, K. y OHTAKA, F. (1984). *J. Zootech. Sci.* **55**, 36.
- TOWNSEND, W. E.; DAVIS, C. E.; LYON, C. E. y MASCHER, S. E. (1980). *J. Food Sci.* **45**, 622.
- TROLLER, J. A. (1987). En *Water Activity: Theory and Applications to Food*. L. B. Rockland y L. R. Beuchat (eds.). Marcel Dekker Inc., Nueva York, pp. 102.
- VANDEKERCKHOVE, P. y DEMEYER, D. (1975). *Fleischwirtsch.* **55**, 680.

- VANDENRIESSCHE, F.; VANDEKERCKHOVE, P. y DEMEYER, D. I. (1980). *Proc. 26th Eur. Meet. Meat Res. Work.* Col. Springs, pp. 128.
- VASSAL, L.; DESMAZEAUD, M. U. y GRIPON, J. C. (1982). *Proc. International Symposium on Enzyme Applications in Foods.* P. Dupuy (ed.). Technique et Documentation Lavoisier, París, pp. 315.
- VERMA, M. M.; LEDWARD, D. A. y LAWRIE, R. A. (1984). *Meat Sci.* **11**, 171.
- VERPLAETSE, A.; DE BOSSCHERE, M. y DEMEYER, D. (1989). *Proc. 35th Int. Congr. Meat Sci. Technol.* Copenhagen, pp. 815.
- VIGNOLO, G. M.; RUIZ HOLGADO, A. P. y OLIVER, G. (1989). *J. Food Prot.* **52**, 787.
- VON BOCKLEMAN, I. y LODIN, L. O. (1974). *Proc. XIX Int. Dairy Congr.*, Nueva Delhi, 1E, pp. 441.
- WAHLROOS, O. y NIINIVAARA, F. P. (1969). *Proc. 15th Eur. Meet. Meat Res. Work.* Helsinki, pp. 240.
- WALLACE, W. J.; HOUTCHENS, R. A.; MAXWELL, J. C. y CAUGHEY, W. S. (1982). *J. Biol. Chem.* **257**, 4966.
- WALLACH, D. P. (1968). *J. Lipid Res.* **9**, 200.
- WARDLAW, F. B.; SKELLEY, G. C.; JOHNSON, M. G. y ACTON, J. C. (1973). *J. Food Sci.* **38**, 1228.
- WASSERMAN, A. E. y KIMOTO, W. (1977). En *Proc. 2nd International Symposium on Nitrite in Meat Products.* B. J. Tinbergen y B. Krol (eds.). Pudoc, Wageningen, The Netherlands, pp. 73.
- WASSERMAN, A. E. y TALLEY, F. (1972). *J. Food Sci.* **37**, 536.
- WATANABE, K. y SATO, Y. (1971). *Agric. Biol. Chem.* **35**, 756.

- WATTS, B. M.; KENDRICK, J.; ZIPSER, M. W.; HUTCHINS, B. y SALEH, B. (1966). *J. Food Sci.* **31**, 855.
- WEGLIICKI, W. B.; WAITE, M.; SISSON, P. y SHOHET, S. B. (1971). *Biochim. Biophys. Acta* **231**, 512.
- WILSON, B. R.; PEARSON, A. M. y SHORLAND, F. B. (1976). *J. Agr. Food Chem.* **24**, 7.
- WILLIAMS, J. C. y GREENE, B. E. (1979). *J. Food Sci.* **44**, 1260.
- WILLS, E. D. (1965). En *Advances in Lipid Research*. R. Aoletti y D. Kritchevsky (eds.). Academic Press, Nueva York, 3, pp. 197.
- WIRTH, F. (1973). *Fleischwirtsch.* **53**, 363.
- WURZIGER, J. y RISTOW, R. (1966). *Fleischwirtsch.* **46**, 971.
- YASOSKY, J. J.; ABERLE, E. D.; PENG, I. C.; MILLS, E. W. y JUDGE, M. D. (1984). *J. Food Sci.* **49**, 1510.
- ZAICA, L. L.; ZELL, T. E.; SMITH, J. L.; PALUMBO, S. A. y KISSINGER, J. C. (1976). *J. Food Sci.* **41**, 1457.
- ZIEGLER, G. R.; RIZVI, S. S. H. y ACTON, J. C. (1987). *J. Food Sci.* **52**, 901.
- ZIPSER, M. W.; KWON, T. W. y WATTS, B. M. (1964). *J. Agric. Food Chem.* **12**, 105.
- ZUBILLAGA, M. P.; MAERKER, G. y FOGLIA, T. A. (1984). *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **61**, 722.