

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



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

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

Olga Díaz Rubio

Bajo la dirección de los doctores

Juan Antonio Ordóñez Pereda
Gonzalo García de Fernando

Madrid, 2002

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA III
(HIGIENE Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS)

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

Memoria que para optar al grado de
Doctor en Veterinaria presenta la
Licenciada Olga Díaz Rubio

Madrid, Febrero de 1994



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 GONZALO GARCIA DE FERNANDO
MINGUILLON, 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 proteasas en el proceso madurativo de los embutidos crudos curados**", de la que es autora la licenciada en Veterinaria Dña. Olga Díaz Rubio, 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, 11 de Febrero de 1994

Fdo.: Juan A. Ordóñez Pereda

Fdo.: Gonzalo García de Fernando

A Angel y a mis padres

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento al Profesor Dr. Bernabé Sanz Pérez por acogerme en el Departamento y por fomentar mi interés por la Bromatología.

Asimismo, quiero expresar mi gratitud al Profesor Dr. Juan Antonio Ordóñez Pereda por la dirección de esta tesis y por su apoyo e inestimable ayuda durante todos estos años de trabajo.

De manera especial quiero agradecer al Profesor Dr. Gonzalo García de Fernando, codirector de esta tesis, por su constante ayuda desde que inicié el trabajo experimental hasta la escritura de esta memoria y por su positiva manera de resolver mis frecuentes dudas.

A los Profesores Dr. Lorenzo de la Hoz y Dra. Isabel Cambero por su amistad, su ayuda y su paciencia ante las variopintas preguntas que les planteé y a las Profesoras Dras. M^a Dolores Selgas y M^a Luisa García por su colaboración siempre que la solicité.

También quiero agradecer a todos los demás miembros del Departamento de Nutrición y Bromatología III su constante y desinteresada ayuda y, especialmente, a Manuela, mi compañera en la dura batalla contra el sachichón; a Claudia, por su amistad y por levantarme la moral de vez en cuando; a Aurora, por echarme una mano con los "papeleos" mucho más de lo que era estrictamente su trabajo; y al resto de los becarios, pasados y presentes, por los buenos momentos que disfruté con ellos en estos años.

Deseo, además, expresar mi gratitud al Profesor Dr. Miguel Angel Asensio y al Dr. Juan José Córdoba, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura, por su

INDICE

	Página
I.- INTRODUCCION	1
I.1.- Clasificación de los embutidos	4
I.2.- Elaboración de embutidos	6
I.2.1. Picado y mezcla de ingredientes	6
I.2.2. Fermentación	12
I.2.3. Maduración	13
I.3.- Microbiología de los embutidos madurados y cultivos iniciadores	14
I.3.1. Microbiología de los embutidos madurados	14
I.3.1.1. Lactobacilos	15
I.3.1.2. Micrococáceas	16
I.3.1.3. Mohos y levaduras	18
I.3.2. Cultivos iniciadores	19
I.4.- Cambios bioquímicos de los componentes de los embutidos durante su maduración, con especial referencia a las proteínas	21
I.4.1. Fermentación de carbohidratos: producción de ácido láctico	21
I.4.2. Efecto de los nitritos	23
I.4.3. Lipólisis y oxidación lipídica	25
I.4.4. Cambios en las proteínas y proteólisis	29
I.4.4.1. Factores tecnológicos	29
I.4.4.2. Cambios de las proteínas y compuestos nitrogenados de los embutidos a lo largo de la maduración	30
I.4.4.2.1. Origen de las proteasas y peptidasas presentes en los embutidos	30

I.4.4.2.2. Cambios en los componentes nitrogenados	33
I.5.- Uso de enzimas en la fabricación de alimentos	40
I.5.1. Finalidades y fuentes de enzimas	40
I.5.2. Enzimas proteolíticas en la fabricación de alimentos	42
I.5.2.1. Características generales y tipos de enzimas proteolíticas	42
I.5.2.2. Proteasas presentes en los embutidos de importancia en su maduración	49
I.5.2.3. Aplicación de proteasas en la industria alimentaria	54
I.5.2.3. Inconvenientes de la utilización de proteasas en los alimentos	57
I.6.- Maduración acelerada de quesos y embutidos	58
I.6.1.- Maduración acelerada de quesos	58
I.6.2.- Maduración acelerada de embutidos crudos curados	64
I.7.- Objetivos perseguidos en el presente trabajo	65
II.- MATERIALES Y METODOS	69
II.1.- Material	70
II.2.- Productos	71
II.2.1. Reactivos	71
II.2.2. Disolventes y purificación de los mismos	71
II.3.- Metodología	72
II.3.1. Determinación de la actividad de las proteasas	72
II.3.1.1. Determinación de la actividad de la pronasa E en diferentes	

condiciones	73
II.3.2. Preparación de las muestras	73
II.3.2.1. Fabricación de los embutidos	73
II.3.2.2. Condiciones de maduración de los embutidos	75
II.3.3. Toma de muestras	76
II.3.4. Determinaciones físicas y fisicoquímicas	76
II.3.4.1. Determinación del extracto seco	76
II.3.4.2. Determinación de cenizas	76
II.3.4.3. Determinación del pH	76
II.3.4.4. Determinación de la actividad de agua	77
II.3.5. Seguimiento de la proteólisis: determinación de distintas fracciones nitrogenadas	77
II.3.5.1. Determinación del nitrógeno total	77
II.3.5.2. Preparación de la muestras utilizadas en la determinación del nitrógeno soluble en agua, no proteico, soluble en ácido fosfotúngstico al 5%, soluble en ácido sulfosalicílico al 5% y básico volátil total	78
II.3.5.3. Determinación del nitrógeno soluble en agua (NSA)	78
II.3.5.4. Determinación del nitrógeno no proteico (NNP)	78
II.3.5.5. Determinación del nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5% (NSF)	79
II.3.5.6. Determinación del nitrógeno soluble en ácido sulfosalicílico al 5% (NSS)	79
II.3.5.7. Determinación del nitrógeno básico volátil total (NBVT)	81
II.3.5.8. Determinación de los aminoácidos libres	82
II.3.5.8.1. Preparación de las muestras	82
II.3.5.8.2. Preparación de la solución patrón de aminoácidos	82
II.3.5.8.3. Derivación de los aminoácidos	83
II.3.5.8.4. Cromatografía de los aminoácidos	83
II.3.5.8.5. Disoluciones empleadas en el análisis de los aminoácidos libres	84
II.3.5.8.6. Condiciones cromatográficas	84
II.3.5.8.7. Identificación y cuantificación de los aminoácidos	84
II.3.5.9. Determinación de aminas	86

II.3.5.9.1. Extracción de las minas	86
II.3.5.9.2. Preparación de los derivados dansilo	87
II.3.5.9.3. Extracción de las aminas dansiladas	87
II.3.5.9.4. Cromatografía de las aminas	87
II.3.5.9.5. Disoluciones empleadas en el análisis de las aminas	88
II.3.5.9.6. Condiciones cromatográficas	88
II.3.5.9.7. Preparación de las disoluciones patrón y del estándar interno	88
II.3.5.9.8. Identificación de las aminas	89
II.3.5.9.9. Cuantificación de las aminas identificadas	89
II.3.6. Métodos microbiológicos	90
II.3.6.1. Preparación de las muestras	90
II.3.6.2. Preparación de los medios de cultivo	90
II.3.6.3. Medios de cultivo utilizados	90
II.3.6.4. Preparación de las diluciones	91
II.3.6.5. Siembra en placas	91
II.3.7. Análisis sensorial	91
II.3.7.1. Panel de catadores	91
II.3.7.2. Pruebas sensoriales	92
II.3.7.2.1. Prueba triangular	92
II.3.7.2.2. Prueba preferencial	92
III.- RESULTADOS Y DISCUSION	93
III.1.- Embutidos de los lotes control	94
III.1.1. Evolución de los parámetros fisicoquímicos	94
III.1.1.1. Extracto seco	94
III.1.1.2. Actividad de agua (a_w)	96
III.1.1.3. Evolución del pH	98
III.1.1.4. Cenizas	100
III.1.2. Evolución de la flora microbiana	100

III.1.3. Estudio de la proteolisis: evolución de las fracciones nitrogenadas	105
III.1.3.1. Nitrógeno total	105
III.1.3.2. Nitrógeno soluble en agua (NSA)	106
III.1.3.3. Nitrógeno no proteico (NNP)	107
III.1.3.4. Nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5% (NSF)	110
III.1.3.5. Nitrógeno soluble en ácido sulfosalicílico al 5% (NSS)	112
III.1.3.6. Nitrógeno básico volátil total (NBVT)	115
III.1.3.7. Aminoácidos libres	117
III.1.3.8. Aminas	125
III.2.- Embutidos elaborados con pronasa E de <i>Streptomyces griseus</i>	132
III.2.1. Evolución de los parámetros fisicoquímicos	132
III.2.1.1. Extracto seco	132
III.2.1.2. Actividad de agua (a_w)	133
III.2.1.3. Evolución del pH	134
III.2.1.4. Cenizas	136
III.2.2. Evolución de la flora microbiana	136
III.2.3. Estudio de la proteolisis: evolución de las fracciones nitrogenadas	136
III.2.3.1. Nitrógeno total	136
III.2.3.2. Nitrógeno soluble en agua (NSA)	136
III.2.3.3. Nitrógeno no proteico (NNP)	142
III.2.3.4. Nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5% (NSF)	144
III.2.3.5. Nitrógeno soluble en ácido sulfosalicílico al 5% (NSS)	146
III.2.3.6. Nitrógeno básico volátil total (NBVT)	148
III.2.3.7. Aminoácidos libres	149
III.2.3.8. Aminas	152
III.2.4. Análisis sensorial	155
III.3.- Embutidos elaborados con aspartil proteinasa de <i>Aspergillus oryzae</i>	158
III.3.1. Evolución de los parámetros fisicoquímicos	158

III.3.1.1. Extracto seco	158
III.3.1.2. Actividad de agua (a_w)	159
III.3.1.3. Evolución del pH	160
III.3.1.4. Cenizas	161
III.3.2. Evolución de la flora microbiana	162
III.3.3. Estudio de la proteólisis: evolución de las fracciones nitrogenadas	162
III.3.3.1. Nitrógeno total	162
III.3.3.2. Nitrógeno soluble en agua (NSA)	162
III.3.3.3. Nitrógeno no proteico (NNP)	166
III.3.3.4. Nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5% (NSF)	168
III.3.3.5. Nitrógeno soluble en ácido sulfosalicílico al 5% (NSS)	169
III.3.3.6. Nitrógeno básico volátil total (NBVT)	171
III.3.3.7. Aminoácidos libres	172
III.3.3.8. Aminas	175
III.3.4. Análisis sensorial	178
III.4.- Embutidos elaborados con papaína de	
<i>Carica papaya</i>	181
III.4.1. Evolución de los parámetros fisicoquímicos	181
III.4.1.1. Extracto seco	181
III.4.1.2. Actividad de agua (a_w)	182
III.4.1.3. Evolución del pH	183
III.4.1.4. Cenizas	185
III.4.2. Evolución de la flora microbiana	185
III.4.3. Estudio de la proteólisis: evolución de las fracciones nitrogenadas	185
III.4.3.1. Nitrógeno total	185
III.4.3.2. Nitrógeno soluble en agua (NSA)	187
III.4.3.3. Nitrógeno no proteico (NNP)	189
III.4.3.4. Nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5% (NSF)	191
III.4.3.5. Nitrógeno soluble en ácido sulfosalicílico al 5% (NSS)	193
III.4.3.6. Nitrógeno básico volátil total (NBVT)	195
III.4.3.7. Aminoácidos libres	196
III.4.3.8. Aminas	199

III.4.4. Análisis sensorial	202
III.5.- Aproximación a las dosis óptimas de proteasas	205
III.5.1. Evolución de los parámetros fisicoquímicos	206
III.5.2. Evolución de las fracciones nitrogenadas	208
III.5.2.1. Nitrógeno soluble en agua, no proteico, soluble en ácido fosfotúngstico al 5%, soluble en ácido sulfosalicílico al 5% y básico volátil total	208
III.5.2.2. Aminoácidos libres y aminas	215
III.5.3. Análisis sensorial	220
IV.- DISCUSION GENERAL	223
V.- CONCLUSIONES	230
VI.- BIBLIOGRAFIA	233

I.-INTRODUCCION

El hombre, como perteneciente al grupo de organismos heterótrofos, cubre sus necesidades nutritivas a partir de numerosos principios suministrados por los alimentos. Los alimentos que consume el hombre proceden de los reinos mineral, vegetal y animal. La contribución del reino mineral se limita, a efecto prácticos, al aporte de agua y ciertas sustancias minerales. Del vegetal consume tallos, semillas, hojas, raíces, frutos, tubérculos y bulbos. Del reino animal utiliza ciertas secreciones (leche), el tejido muscular estriado, vísceras y otros subproductos, huevos y miel.

Entre toda esta diversidad de productos, la carne ha sido un alimento muy apreciado por el hombre desde la antigüedad; sin embargo, dado su carácter perecedero, sólo podía consumirse en épocas de caza. Por ello, el hombre sintió la necesidad de ampliar su vida útil desarrollando diversos métodos, como el ahumado, la salazón, el desecado o el escabechado. En los países mediterráneos, dadas las condiciones climáticas del invierno, la fermentación y secado de la carne fue uno de los métodos de conservación más temprana y ampliamente utilizado; Erichsen (1983) estima que hace más de 3000 años ya se consumían productos cárnicos fermentados y secos.

Se sabe que griegos y romanos dominaban las técnicas chacineras; en la Roma precristiana, durante las fiestas florales y lupercales, se consumía gran cantidad de embutidos ("termicina", "circeli" y "botuli"), elaborados con carne de cerdo, tocino, pimienta y semillas de comino. Dado el carácter pagano de estas fiestas, la Iglesia de los primeros siglos de la era cristiana llegó a prohibir la elaboración y consumo de embutidos por su estrecha relación con ellas. La prohibición se mantuvo hasta el año 494 d. de C., cuando dichas fiestas se cristianizaron (Sanz, 1988). Desde entonces los embutidos han ido cobrando una popularidad cada vez mayor hasta llegar a nuestros días.

Actualmente la fermentación y secado de la carne ha dejado de ser un método cuyo objetivo primero era la conservación para convertirse en una forma de diversificación de productos. La pérdida de la estacionalidad en la disponibilidad de la carne, el desarrollo de la refrigeración y congelación y el de otros procesos tecnológicos han transformado la

fabricación de los embutidos en un método encaminado a la obtención industrial de productos muy variados, de alta calidad y con características muy distintas a las de las materias primas originales. A esto se une su prolongada vida útil sin necesidad de otras medidas de conservación y el escaso riesgo sanitario que su consumo conlleva, lo que ha ocasionado que la producción de embutidos fermentados y madurados se haya convertido en uno de los sectores más importantes de la industria cárnica europea, y que esté ganando interés en otros lugares del mundo, tales como Estados Unidos y Australia (Demeyer y col., 1986).

La estabilidad y el escaso riesgo sanitario de estos alimentos se debe fundamentalmente a:

- El descenso del pH hasta valores comprendidos entre 5,2 y 4,8 (Bacus, 1986), producido por la fermentación microbiana de los carbohidratos ya presentes en la carne y, sobre todo, los añadidos con tal fin a los embutidos.

- El descenso de la actividad de agua (a_w), debido a los solutos añadidos (sal, carbohidratos, etc.) y, sobre todo, a la deshidratación parcial que acaece durante la fase de maduración, con lo que dicho parámetro disminuye desde valores iniciales de 0,95-0,96 hasta aproximadamente 0,75 (Burgos, 1981).

- La adición de nitratos y nitritos a los embutidos contribuye, junto con los dos factores anteriores, a prevenir el crecimiento de microorganismos patógenos, entre ellos *Cl. botulinum*. Según Genigeorgis (1978), 50 ppm de NaNO_2 son suficientes para evitar su crecimiento.

- La producción de sustancias bactericidas y bacteriostáticas, producidas por la flora láctica predominante en los embutidos, tales como peróxido de hidrógeno, antibióticos y bacteriocinas (Daeschel, 1989; Rodríguez y col., 1989). Estos compuestos actúan como inhibidores del crecimiento de microorganismos alterantes y patógenos en estos productos.

- Las especias poseen una marcada actividad antimicrobiana debida, parece ser, a los

aceites esenciales que contienen (Beuchat, 1976; Zaika y Kissinger, 1981).

Todos estos fenómenos y agentes ocasionan conjuntamente el establecimiento de unas condiciones disgenéticas en las que los microorganismos productores de toxiinfecciones alimentarias y otros no deseables difícilmente pueden multiplicarse.

Asimismo, la mayoría de estos factores "conservantes" también condicionan el desarrollo de las características sensoriales típicas, ora por sí mismos (endurecimiento por pérdida de humedad; sabor de las especias), ora por su influencia en la selección de la flora típica que se implanta y en el desarrollo de la actividad enzimática y degradativa de los componentes del embutido durante la maduración.

I.1. CLASIFICACION DE LOS EMBUTIDOS.

Los embutidos crudos madurados se pueden clasificar basándose en diversos criterios, como la acidez, el tamaño de picado de los ingredientes, adición o no de cultivos iniciadores, presencia de mohos superficiales, adición de unos u otros ingredientes, especias y condimentos, etc. De acuerdo con Incze (1992), todos estos factores, aparentemente arbitrarios, influyen decisivamente en las características generales de los productos, por lo que serían parámetros de clasificación válidos, ya que implican diversas tecnologías de fabricación. Por ejemplo, con arreglo a su acidez se han clasificado en:

1) Productos cárnicos fermentados de baja acidez: se encuadran los embutidos europeos típicos, deshidratados a baja temperatura (Incze, 1987). Son productos de maduración larga, con un pH relativamente elevado, generalmente superior a 5,5. Dentro de esta categoría se incluyen todos los tipos de salami (Leistner, 1990).

2) Productos cárnicos fermentados de elevada acidez: son productos a los que se les añaden carbohidratos, consiguiéndose un pH final menor de 5,3. Estos embutidos se fabrican tanto en Europa como en Estados Unidos, con la diferencia que los primeros se someten a fermentación a baja temperatura (20-24°C), mientras que en los segundos se

utilizan temperaturas elevadas (37°C aproximadamente).

El Código Alimentario Español, por su parte, no clasifica los embutidos fermentados por sus características fisicoquímicas, sino que lo hace con arreglo a los ingredientes empleados en su fabricación. Desde este punto de vista, define con el nombre de embutidos crudos a aquellos que "han sido sometidos únicamente al adobo y amasado antes de llenado en tripa, madurados o no, y sometidos posteriormente al secado y ahumado o no. No contendrían tejido fibroso, cartilaginoso ni sebos".

Los embutidos crudos fermentados se encuentran clasificados como embutidos de carne. En esta categoría se incluyen dos elaboraciones tradicionales:

- Chorizo: "es el embutido crudo, curado y encarnado elaborado con carne de cerdo o de cerdo y vacuno, metido en tripa natural o artificial de diámetro superior a 22 milímetros. El diámetro inferior se denominará "longaniza".

- Salchichón: "es el embutido crudo, curado y blanco elaborado con carne de cerdo o de cerdo y vacuno, con la adición de cubitos de tocino o tocino finamente picado, metidos en tripa artificial o natural cular o semicircular, porcina o vacuna, de 40 milímetros de diámetro como mínimo. Cuando el diámetro de la tripa es inferior al señalado, el derivado cárnico se denomina "longaniza imperial" o "fuet".

Es un hecho casi general que el chorizo contenga, entre otros condimentos que dependen de recetas tradicionales, ajo y pimentón, y el salchichón pimienta negra en grano o molida.

Considerando la forma más común de fabricación, los embutidos crudos fermentados españoles podrían encuadrarse dentro de los productos cárnicos fermentados de elevada acidez, ya que la temperatura de fermentación y maduración, adición de sal, pH y adición de carbohidratos más comunmente empleados en estos productos son similares a los reseñados por Incze (1992) para aquel tipo de embutidos.

I.2. ELABORACION DE EMBUTIDOS.

Se puede decir que la elaboración de embutidos se realiza en tres fases:

- Picado y mezcla de ingredientes,
- Fermentación,
- Secado o maduración.

I.2.1. Picado y mezcla de ingredientes.

Consiste básicamente en el picado de la carne, su mezcla con sal, especias y otros ingredientes y el picado de la grasa y su adición a la masa anterior. Una vez mezclados todos los ingredientes, la pasta resultante se embute en tripas naturales o artificiales. La forma en que se realizan estas operaciones define en gran parte las características del producto final.

El **picado de la carne** se suele realizar a bajas temperaturas, entre -1°C y -3°C , de forma que el corte sea limpio y no se libere grasa intramuscular en las carnes no magras, lo que podría producir alteraciones del color durante la maduración. Las carnes empleadas deben ser firmes, con capacidades tampón y de retención de agua óptimas y con valores de pH entre 5,4 y 6,0 (Pezacki, 1979). Por tanto, no se consideran útiles en la fabricación de embutidos ni las carnes DFD, dada su excesiva capacidad de retención de agua y elevado pH, ni las PSE, debido a su bajísima actividad tampón; no obstante estas últimas pueden emplearse en la formulación de algunos tipos de embutidos como el salami (Towsend y col., 1978). También se prefieren las carnes de animales adultos o incluso viejos (Lücke, 1984) por su mayor contenido en mioglobina, lo que ocasiona un mejor desarrollo del color.

Como ya se ha señalado, previamente a la mezcla con el otro ingrediente mayoritario, la grasa, se añaden a la carne otros componentes importantes en las características del producto final, como la sal, especias, carbohidratos, nitratos y nitritos, ácido ascórbico y

cultivos iniciadores.

La sal es el ingrediente que se añade en mayor proporción a los embutidos después de la carne y la grasa, habitualmente entre 2,4 y 3,0% (Lücke, 1984). Desempeña un papel muy importante en el desarrollo de distintas características de estos productos, destacando, desde el punto de vista tecnológico, su efecto sobre las proteínas, la textura y la potenciación del sabor de estos productos. La sal contribuye decisivamente a la ligazón de las partículas del embutido y, por lo tanto, al desarrollo de la textura, permitiendo una mayor solubilización de las proteínas y su posterior gelificación (véase I.4.4.1). Su contribución al sabor es, por una parte, directa, resaltando el sabor salado y estimulando los receptores, con lo que se potencia la percepción del sabor a carne curada (Amerine y col., 1965; Froelich y col., 1983), y, por otra, indirecta, por su influencia sobre la actividad de las catepsinas musculares (Baldini y col., 1977; Barret y Kirschke, 1981).

Posee, además, una acción bacteriostática sobre la flora aerobia responsable de la alteración de la carne fresca, así como sobre algunos patógenos (Ingram y Kitchell, 1967), debido a que induce, junto con otros solutos (carbohidratos, nitratos, nitritos, etc.), un descenso de la a_w hasta valores de 0,97-0,96. Este hecho, de forma indirecta, favorece el desarrollo de la flora láctica (Pezacki, 1979), ya que las bacterias aerobias Gram-negativas y la flora patógena son muy sensibles a los descensos de a_w y la láctica se desarrolla perfectamente en tales condiciones.

Como efecto adverso, puede potenciar los fenómenos autoxidativos de las grasas (Goutefongea, 1991).

Las especias se emplean en la mayoría de los embutidos en proporciones del 0,5-2,0%, utilizándose más cantidad en productos secados al aire que en embutidos ahumados. Se usan la pimienta blanca y negra, pimentón, orégano, ajo, mostaza, etc. Estos

aditivos poseen distintas propiedades fisicoquímicas que los hacen muy útiles en la fabricación de embutidos fermentados. Tienen un efecto estimulador de la formación de ácido láctico, que parece deberse al elevado contenido en manganeso de algunas de ellas, elemento necesario para la actividad de algunas enzimas de la cadena respiratoria de los lactobacilos (Puglia y Seperich, 1983). Además, presentan actividad antioxidante, posiblemente por su capacidad quelante de metales (Lee y col., 1986), inhibiendo la aparición de la fase inicial de la autoxidación (Barbut y col., 1985). Por último, también muestran actividad antimicrobiana, localizada en la fracción de aceites esenciales (Beuchat, 1976; Zaika y Kissinger, 1981; Farag y col., 1989).

Los hidratos de carbono se utilizan en la fabricación de embutidos fermentados con objeto de conseguir una fermentación correcta y un adecuado descenso del pH, sirviendo como sustrato energético de las bacterias lácticas que, al multiplicarse, logran la inhibición, al menos temporal, del crecimiento de bacterias alterantes y crean condiciones para la generación de un sabor y firmeza adecuados. Las cantidades de carbohidratos recomendadas se sitúan entre 0,4 y 0,8% (Pyrzcz y Pezacki, 1981); sin embargo, hay que tener siempre en cuenta el tipo de hidrato de carbono que se añade, ya que a mayor peso molecular, menor velocidad de fermentación: la glucosa fermenta muy rápidamente, la sacarosa más lentamente y aún más despacio la dextrina (Pezacki, 1979). El uso de gran cantidad de carbohidratos rápidamente fermentables producirá un descenso del pH muy brusco y temprano, y no permitirá el desarrollo de las bacterias ácido-sensibles útiles, las micrococáceas, con lo que el embutido no adquirirá completamente las características deseadas. Por el contrario, el uso exclusivo de hidratos de carbono de fermentación lenta provocará un descenso más lento del pH y existirá el riesgo de que se desarrollen bacterias alterantes. Esto mismo puede suceder si se añaden cantidades demasiado pequeñas de carbohidratos. Por lo tanto, lo más recomendable parece ser añadir una mezcla de varios tipos de estos compuestos (Pezacki, 1979; Lücke, 1984).

En la preparación de embutidos fermentados se utilizan a veces otros tipos de **sustancias acidulantes**, como glucono- δ -lactona y ácidos orgánicos encapsulados. La glucono- δ -lactona se transforma en ácido glucónico en la fase acuosa del embutido, produciendo un descenso rápido y acusado del pH a las pocas horas del amasado y estufaje. Los ácidos orgánicos se encapsulan dentro de cubiertas adecuadas para que su liberación se produzca en un momento determinado, en general al elevar la temperatura. El problema del uso de estas sustancias estriba en que provocan un descenso del pH demasiado rápido, con lo que, aunque la calidad higiénica del producto se mejore, puede verse afectada desfavorablemente la formación del color debido a la inhibición de las micrococáceas. Por ello, solamente se recomienda su uso en embutidos fermentados de consumo en fresco (Lücke, 1984; Incze, 1992).

Los nitritos se añaden a los embutidos bien como tales o bien en forma de nitratos. Su papel en los embutidos fermentados es muy importante, ya que producen el color rosado-violáceo típico por su reacción con la mioglobina; contribuyen a la producción del sabor y aroma propios de estos productos; inhiben procesos autooxidativos y tienen una acción antimicrobiana selectiva, interviniendo, con ello, en el establecimiento de la flora gram-positiva apropiada: lactobacilos y micrococáceas (Lücke, 1984). Los nitratos no realizan estas funciones directamente, sino a través de su reducción a nitritos y estos a óxido nítrico, merced a las micrococáceas presentes.

A pesar de todos estos efectos beneficiosos de los nitritos, existen una serie de problemas asociados a su uso, como son la formación de nitrosaminas y las reacciones con componentes de la carne para dar lugar a productos no bien identificados (Cassens y col., 1979), aunque estos problemas alcanzan mayor importancia en otros productos cárnicos, como en los que se aplica un tratamiento térmico elevado (cocción) y, de forma especial, los sometidos a fritura para su consumo, como el bacon. Por esto, las cantidades de nitrato están

reguladas legalmente en la mayoría de los países; en España la cantidad máxima permitida en chorizo y salchichón es de 300 ppm de nitrato sódico y nitrato potásico, y de 150 ppm de nitrito sódico y nitrito potásico (Resolución de la Secretaría de Estado para la Sanidad del 21 de agosto de 1979, B.O.E. del 12-11-79).

El **ácido ascórbico** y el **ascorbato sódico** se emplean muy frecuentemente en la fabricación de embutidos como coadyuvantes del curado, ya que, en cantidades correctas (0,03-0,05%), mejoran el color, aroma y sabor del producto. El efecto sobre el color se debe a la acción antioxidante del ascorbato sobre la mioglobina, unido a su capacidad para reducir los nitritos a óxido nítrico y transformar el hierro trivalente en divalente, formándose nitrosomioglobina (Toth, 1983). Por otra parte, la mejora en el aroma y sabor de los embutidos se atribuye a reacciones entre el ácido ascórbico y el nitrito, todavía no bien conocidas (Brown y col., 1974).

Desde el punto de vista sanitario, bloquean la formación de N-nitrosaminas, posiblemente al hacer que el nitrito no se encuentre disponible para reaccionar con las aminas presentes en el medio (Mirvish y col., 1972).

Los **cultivos iniciadores** se añaden también en el momento inicial, al mezclarse los ingredientes. El papel que desempeñan es de máxima importancia y se desarrollará posteriormente en el apartado I.3.2.

Además de los ingredientes antes señalados, que son los que se utilizan con mayor frecuencia en la elaboración de embutidos madurados, existen una serie de **aditivos** que pueden añadirse con diversos fines: colorantes (naturales o artificiales), emulgentes (polifosfatos, proteínas no cárnicas), conservadores (sorbatos), correctores y potenciadores del sabor (ácidos glutámico, inosínico y guanílico), etc. (Cenzano, 1991).

El **picado de la grasa** se efectúa, al igual que el de la carne, a bajas temperaturas. El tamaño de la partículas obtenidas determinará, junto con otros factores, el tipo de producto que se obtendrá. El grado de reducción de tamaño influye de forma importante en la eliminación de agua, que será más lenta en los de picado fino respecto a los de picado más grueso (Stiebing y Rödel, 1988). La grasa más adecuada para la fabricación de estos productos es la del cerdo y, dentro de esta especie, la que presenta un menor contenido en ácidos grasos insaturados y, por tanto, con un punto de fusión relativamente elevado, siendo muy útil la procedente del tocino dorsal.

Una vez picados, los ingredientes se mezclan con los aditivos en una amasadora para conseguir una distribución homogénea de todos ellos. Esta operación se efectúa generalmente aplicando vacío, para conseguir eliminar la mayor cantidad de oxígeno posible de la masa, ya que este gas interfiere en la formación del color y sabor deseables en estos productos.

Inmediatamente después se puede realizar la **embutición en tripas**, aunque algunos fabricantes dejan la pasta en refrigeración (5-10°C) de 12 a 48 horas antes de embutirla, iniciándose entonces la multiplicación de los cultivos iniciadores añadidos y/o la flora presente y las reacciones de curado.

La embutición se realiza en máquinas a vacío y con la pasta a una temperatura de unos 2°C (Lücke, 1984). Se pueden usar tripas naturales o sintéticas; en este caso, deben permitir la difusión de agua desde el interior de la pieza, el paso del humo (en el caso de que el ahumado se realice) y deben adaptarse a los cambios de tamaño del embutido durante el proceso madurativo, debidos a la deshidratación. Según el diámetro de tripa utilizado, el embutido recibirá distintos nombres, que variarán según las regiones (longaniza imperial, fuet, salchichón, salchichonada, etc). Durante la maduración, cuanto mayor sea el calibre, más lenta es la pérdida de agua y, por ende, más lenta la adquisición de la consistencia típica; el centro del embutido presentará menor deshidratación, en tanto que la parte externa contendrá menos agua. En embutidos de calibre estrecho la pérdida de agua es más uniforme

(Stiebing y Rödel, 1988).

I.2.2. Fermentación.

Después de la embutición, las piezas se llevan a secaderos o cámaras con humedad, temperatura y velocidad de aire controladas, en las cuales se mantienen a temperaturas de 20-28°C y humedades relativas del 90-95% durante 24-48 horas. De esta forma se facilita el crecimiento de los microorganismos y se evita la formación de una costra externa, que aparecería en el caso de utilizar humedades relativas más bajas, lo que dificultaría el secado posterior de los embutidos.

Durante el período de fermentación se producen importantes cambios fisicoquímicos y microbiológicos: reducción de nitratos a nitritos y éstos a óxido nítrico, que reaccionará con la mioglobina rindiendo nitrosomioglobina, gracias a la actividad de las micrococáceas; las bacterias lácticas empiezan a metabolizar los carbohidratos, acumulándose ácido láctico con el consiguiente descenso del pH; cuando éste alcanza valores cercanos al punto isoelectrico de las proteínas de la carne, éstas pierden capacidad de retención de agua, facilitándose la deshidratación.

En ciertos tipos de embutidos fermentados se efectúa un ahumado al final del período de fermentación. Con ello se consigue modificar el aroma y sabor del producto y se evita el crecimiento de mohos y levaduras superficiales en aquellos productos en que su presencia no es deseable, ya que muchos de los componentes del humo tienen actividad antimicrobiana (fenoles, compuestos carbonílicos, como formaldehído, y ácidos orgánicos de bajo peso molecular); el humo también contiene antioxidantes (derivados fenólicos). El humo se produce por combustión controlada de maderas no resinosas a 350-600°C y se aplica de diversas formas: ahumado tradicional en frío o en caliente, electrostático o por tratamiento con condensados de humo (Girard, 1991).

I.2.3. Maduración.

La maduración de los embutidos se realiza también en cámaras con humedad y temperatura controladas, pudiendo utilizarse las mismas empleadas para la fermentación aunque cambiando las condiciones. Estas variarán según el tipo de embutido que se fabrique, pero generalmente oscilan entre 10 y 17°C de temperatura y 65-80% de humedad relativa. La velocidad del aire suele ser, aproximadamente, de 1m/s, y éste debe repartirse uniformemente por la sala y alrededor de los embutidos, de forma que el secado sea homogéneo. Este período se prolonga normalmente durante 20-60 días, dependiendo del embutido que se desee obtener.

Durante el período de maduración se producen reacciones enzimáticas, fundamentalmente de origen microbiano, que degradan lípidos y proteínas. También se produce una fuerte deshidratación y se desarrolla la textura característica (véase I.4.4.1). El contenido en agua desciende hasta el 35% o incluso menos, reduciéndose la actividad de agua por debajo de 0,90. Bajo estas condiciones, el crecimiento bacteriano se inhibe si se evita la condensación de agua en la superficie del embutido (Lücke, 1984). Hacia el final de la maduración se produce un ligero incremento del pH, debido principalmente a la acumulación de productos de degradación de las proteínas, tales como amoníaco y aminos (Lücke, 1984). Sin embargo, Demeyer y col. (1979) lo atribuyen también al aumento de la concentración de compuestos tampón y al descenso en la disociación de los electrolitos ya presentes.

Las condiciones de temperatura y humedad en las fases de fermentación y maduración antes mencionadas se refieren a los embutidos fabricados en Europa. En Norteamérica se prefieren productos más ácidos, siendo las temperaturas de fermentación bastante más elevadas, entre 32 y 45°C, especialmente en los embutidos semisecos. En algunos casos se efectúa un calentamiento aún mayor al final de la fermentación, de forma que se alcancen 58°C en el centro de las piezas, para excluir la posible presencia de *Trichinella spiralis*.

I.3. MICROBIOLOGIA DE LOS EMBUTIDOS MADURADOS Y CULTIVOS INICIADORES.

I.3.1. Microbiología de los embutidos madurados.

La composición de la microflora de los embutidos antes del período de fermentación es muy heterogénea, pues depende de los ingredientes utilizados, principalmente de la grasa y la carne, y de las condiciones en que se realicen las operaciones previas a la embutición.

En la carne y otros ingredientes, y por tanto en un embutido recién preparado, pueden aislarse lactobacilos, micrococáceas, enterobacterias, *Leuconostoc*, algunas especies de los géneros *Clostridium*, *Pediococcus*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, enterococos, etc., y también mohos y levaduras. Por lo que respecta a microorganismos patógenos, se han detectado a menudo bacterias del género *Clostridium*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (Hechelman y Kasprowiak, 1991). Dada la diversidad de la flora, las primeras horas de la fase de fermentación son especialmente críticas, ya que el producto todavía no se ha estabilizado por el descenso del pH y la a_w . La carga inicial de microorganismos viables totales suele situarse entre 10^5 - 10^6 u.f.c./g (López Lorenzo y col., 1962; Giolitti y Massacra, 1963). Pronto comienza a multiplicarse la flora típica (lactobacilos y micrococáceas), lo que provoca cambios drásticos en el "ambiente" interno del embutido: en este período se acumula ácido láctico con el consiguiente descenso del pH, se desarrolla el color rosado característico, se produce la gelificación de las proteínas y comienza la generación de las sustancias que darán lugar al aroma típico. Por lo que respecta a la inhibición microbiana, se desarrollan condiciones de anaerobiosis en el interior de las piezas y la sal añadida a la masa disminuye el agua libre disponible (Hechelman y Kasprowiak, 1991); a estos factores habrá que unir la acción inhibitoria del nitrito sobre determinados microorganismos no deseables y el efecto del ácido láctico.

Al iniciarse la fase de fermentación, las micrococáceas experimentan un incremento

muy rápido, alcanzando niveles comprendidos entre 10^5 y 10^7 u.f.c./g (Nurmi, 1966; Reuter y col., 1968; Selgas y col., 1988). Este crecimiento se detiene pronto debido a la acidificación, de tal forma que sus tasas declinan de forma notable a partir de los 15-20 días de maduración (DeKeteleare y col., 1974; Lücke, 1984). Simultáneamente, el número de lactobacilos aumenta hasta valores del orden de 10^8 u.f.c./g (Girard y Bucharles, 1991), obteniéndose recuentos similares a los de la flora total, lo que indica que estos microorganismos constituyen la flora mayoritaria. Estos niveles se mantienen hasta el final de la maduración.

Las bacterias Gram-negativas, en cambio, experimentan un descenso constante para desaparecer rápidamente (Reuter y col., 1968).

I.3.1.1. LACTOBACILOS.

Los lactobacilos homofermentativos constituyen la población dominante a lo largo de la maduración (Coretti, 1958; Hoffman y Scharner, 1980; Sanz y col., 1988), debido principalmente a su efecto inhibitorio sobre otras bacterias. Las especies más frecuentemente encontradas en los embutidos crudos curados son *Lactobacillus sake*, *L. curvatus* y *L. plantarum* (Lücke, 1986).

El papel fundamental de la flora láctica es la fermentación de los azúcares que ocasiona la acumulación de ácido láctico, cuyas funciones se citarán más adelante (véase I.4.1).

Aunque las bacterias lácticas presentan actividad lipolítica, esta no parece ser muy marcada (Stadhouders y Veringa, 1973). Dicha actividad es tanto extra- como endocelular, siendo la última mucho más limitada; recae sobre mono- y diglicéridos, y sobre triglicéridos con ácidos grasos de cadena corta (Parejo y col., 1979; Sanz y col., 1988). Teniendo en cuenta que la concentración de di- y monoglicéridos es muy baja al principio de la maduración, será necesaria una lipólisis previa, probablemente realizada por las micrococáceas, para que actúen las lipasas de las bacterias lácticas; de aquí que se haya

postulado la existencia de una acción colaborativa entre ambos tipos de bacterias (Sanz y col., 1988).

Algunas cepas de lactobacilos aisladas de embutidos fermentados son capaces de hidrolizar péptidos (Reuter, 1971), al igual que sucede en cepas procedentes de quesos (Reiter y col., 1969). Sin embargo, sólo presentan una ligera actividad proteolítica sobre proteínas complejas (Reuter, 1971) y, aunque la actividad de las bacterias lácticas parece contribuir al incremento de la tasa de aminoácidos (Montel y col., 1992), su papel concreto en la proteólisis de los embutidos no está todavía bien determinado.

I.3.1.2. MICROCOCCACEAS.

Las bacterias de la familia *Micrococaceae* presentes en los embutidos pertenecen a los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus*. En general, los primeros crecen mejor en anaerobiosis, por lo que son más abundantes que los micrococos en los embutidos (Rheinhaben y Hardlock, 1979; Fischer y Schleifer, 1980). Las especies identificadas más frecuentemente son *S. xilosus* y *S. saprophyticus*, y, en segundo plano, *S. simulans* y *M. varians* (Fischer y Schleifer, 1980).

Durante la fase de fermentación, las micrococáceas experimentan un gran incremento previo al que se produce en los lactobacilos (Roziar, 1969), para mantenerse e incluso descender en etapas posteriores de la maduración (DeKeteleare y col., 1974). Sólo en el caso de embutidos preparados con muchos nitratos y pocos carbohidratos, estos microorganismos pueden llegar a ser la flora mayoritaria (Auroylet y Fornaud, 1976; Sarra y col., 1982), lo que se debe a que no son capaces de desarrollarse a valores de pH bajos, como los que se alcanzan en los embutidos después de la fermentación (Lücke, 1984).

Las principales características de las micrococáceas relacionadas con los fenómenos que acaecen durante la maduración de los embutidos son:

a) Actividad nitrato y nitrito reductasa: esta capacidad hace que sea posible el desarrollo del típico color de curado en estos productos, al reaccionar el óxido nítrico

formado con la mioglobina rindiendo nitrosomioglobina, de color rosado (una descripción más detallada del proceso se realiza en el apartado I.4.2). Las ventajas de la reducción realizada por estas bacterias es que no se producen, a partir de los nitritos, nitratos que permanezcan en la carne, como ocurre con otras sustancias reductoras, sino que los nitritos se transforman en óxido nítrico. Realmente, las micrococáceas, de forma natural, tratan de reducir los nitratos, nitritos y óxido nítrico a otras formas nitrogenadas más elementales, como nitrógeno molecular (Liepe, 1982) o amoníaco (Zaika y col., 1976), pero en los embutidos este proceso se interrumpe debido a la gran reactividad del óxido nítrico con la mioglobina que se encuentra en el medio.

b) Producción de catalasa: después de la fase de fermentación, en los embutidos existen peróxidos, tanto procedentes de los láctobacilos como originados abióticamente. La catalasa tisular pierde rápidamente su actividad durante dicho período (Rozier, 1971), por lo que no tiene un papel relevante en el desdoblamiento de estas sustancias. Los peróxidos oxidan el hierro del anillo de porfirina y el color de curado se altera, dando tonalidades grisáceas o marrones; a altas concentraciones, también el anillo puede ser atacado y se observan coloraciones verdosas. Por ello, la presencia de catalasa procedente de las micrococáceas es fundamental para desdoblar el H_2O_2 e impedir estas alteraciones del color.

c) Producción de lipasas: la actividad lipolítica de los micrococos ha sido puesta de manifiesto por numerosos autores (Cantoni y col., 1967; Debevere y col., 1976; Selgas y col., 1986). En los embutidos, los ácidos grasos insaturados de cadena larga, liberados por la acción de las lipasas, son degradados a carbonilos y ácidos grasos de cadena corta, formándose peróxidos como metabolitos intermedios (Cerise y col., 1973). De este modo participan las micrococáceas en la generación del sabor y aroma (Smith y Alford, 1968). Recientemente, Berdagué y col. (1992) han confirmado que las micrococáceas son los microorganismos que más contribuyen al desarrollo del aroma de los embutidos al provocar la liberación de compuestos volátiles.

d) Actividad proteolítica: la actividad proteolítica de las micrococáceas ha sido puesta

de manifiesto por distintos autores (Sajber y col., 1971; Bacus, 1986), contribuyendo de forma destacada en la proteólisis en general y en la liberación de aminoácidos. Cantoni y col. (1975) les atribuyen un papel principal, aunque otros autores (Demeyer y col., 1992) consideran que dicha función la comparten con las proteasas tisulares.

I.3.1.3. MOHOS Y LEVADURAS.

Los mohos y levaduras colonizan con frecuencia la superficie de los embutidos secos ligeramente o no ahumados, siempre que la humedad relativa de la cámara de maduración no sea demasiado baja. También se ha detectado la presencia de levaduras en el interior de productos fermentados (Smith y Palumbo, 1973; Palumbo y col., 1976).

Dependiendo de la temperatura inicial a la que se sometan estos productos, el desarrollo de los mohos y levaduras se producirá en algunos días o semanas.

Los efectos favorables de la presencia de flora superficial son (Lücke, 1986):

1. Efecto antioxidante: reducen la tensión de oxígeno en la superficie, degradan los peróxidos y protegen del efecto prooxidante de la luz. Todo esto conduce a una inhibición del enranciamiento y a una estabilización del color de curado.

2. Creación de un microclima superficial: evitan la formación de costra superficial y favorecen la deshidratación uniforme del embutido.

3. Capacidad lipolítica y proteolítica: conduce a la formación de sustancias sápidas y aromáticas, contribuyendo al sabor y aroma característicos de los embutidos. Estas sustancias se difunden bien en embutidos de pequeño calibre, haciéndolo más lentamente en los de mayor diámetro (Leistner, 1987).

4. Modificación de la apariencia de los embutidos: este efecto es positivo en ciertos países, sobre todo en el sur de Europa, en donde los consumidores prefieren embutidos con flora superficial.

En cuanto a los efectos desfavorables, son dos principalmente:

a) Posible producción de micotoxinas: las micotoxinas son metabolitos secundarios de ciertas especies fúngicas, con DL50 similares a tóxicos fuertes, tales como el anhídrido arsenioso (As_2O_3) y el parathion (Fink-Gremmels y col., 1989). La producción de estos compuestos sucede tanto en condiciones experimentales como durante la maduración de los embutidos. Las micotoxinas pueden difundir hacia el interior del producto y pueden encontrarse en él después de eliminar la capa superficial de mohos (Orth, 1977; Leistner y Eckardt, 1981; Leistner, 1984). Para evitar este efecto adverso se han propuesto distintos métodos, como el empleo de un cultivo fúngico iniciador sin capacidad toxicogénica, el envasado a vacío de productos con baja actividad de agua (Wirth, 1979) o la impregnación de la superficie de los productos con sustancias antifúngicas como sorbato potásico (Leistner y col., 1975).

b) Incremento del pH: el pH aumenta de forma apreciable durante la fase final de la maduración de los embutidos que presentan mohos y levaduras en su superficie. Esta flora, en presencia de oxígeno, puede oxidar aminoácidos y ácido láctico, lo que ocasiona un aumento del pH hasta valores cercanos a 7 en algunos casos (Lücke, 1986). Hechelmann y col. (1988) han señalado que, en estas condiciones, pueden desarrollarse microorganismos patógenos como *S. aureus* especialmente en las zonas más superficiales del producto, ya que esta bacteria es bastante resistente a condiciones de a_w reducida (Troller y Christian, 1978), aunque no se ha demostrado la producción de enterotoxinas por debajo de a_w de 0,93 (Troller y Stinson, 1975).

I.3.2. Cultivos iniciadores

Liepe (1983) define los cultivos iniciadores como cultivos individuales o mixtos de cepas seleccionadas, con una determinada actividad enzimática, que se añaden intencionadamente en cantidades definidas para que transformen un sustrato en un producto

alimenticio. Por su parte, Smith y Palumbo (1983) los definen como microorganismos viables añadidos directamente a la carne para mejorar su conservabilidad, su estado higiénico y/o potenciar la aceptabilidad por el consumidor; además, la calidad nutritiva del producto debe mantenerse o mejorarse con respecto a la materia prima.

En Europa, a diferencia de lo que sucede en Norteamérica y en otros lugares, el período de fermentación de los embutidos es más largo y se realiza a menores temperaturas; es decir, se prefiere un descenso de pH más lento que permita el desarrollo de microorganismos que originen las características sensoriales requeridas por sus consumidores. Por ello, se suelen emplear mezclas de bacterias lácticas y micrococáceas, e incluso una pequeña cantidad de las primeras en los países del sur de Europa, donde el sabor ácido es más bien un efecto negativo.

Se pueden distinguir 2 tipos de cultivos iniciadores, los cultivos iniciadores propiamente dichos, con los que se intenta inducir cambios sensoriales deseables en el producto; y los cultivos protectores, utilizados para inhibir la flora microbiana no deseable en los embutidos (Geisen y col., 1992).

La finalidad con la que se añaden los cultivos iniciadores a los embutidos secos se puede resumir de la siguiente manera (Kunz, 1989):

1. Control del proceso madurativo.
2. Inhibición de microorganismos no deseables.
3. Reducción de riesgos sanitarios.
4. Incremento de la calidad y normalización.
5. Control del sabor y aroma específicos

Los microorganismos que más frecuentemente se utilizan en la industria son las bacterias lácticas y las micrococáceas, aunque también empiezan a usarse hongos y levaduras. También se ha propuesto la inclusión de estreptomicetos (*Streptomyces griseus*) y de enterobacterias, como *Aeromonas* spp en los cultivos iniciadores (Hammes y col., 1985).

Streptomyces griseus es uno de los microorganismos componentes de un iniciador

comercializado y se considera que mejora el sabor y aroma de los embutidos fermentados (Eilberg y Liepe, 1977). Sin embargo, en los embutidos fabricados de forma "natural" (sin añadir cultivos iniciadores), los estreptomicetos se encuentran en escaso número y no crecen en la pasta durante la fermentación. Por otra parte, algunas especies del género *Aeromonas* parecen ejercer un efecto positivo en las características de los embutidos y actualmente se utilizan en una industria española en la elaboración de estos productos (Niinivaara, 1991).

I.4. CAMBIOS BIOQUIMICOS EN LOS COMPONENTES DE LOS EMBUTIDOS DURANTE SU MADURACION, CON ESPECIAL REFERENCIA A LAS PROTEINAS Y COMPUESTOS NITROGENADOS.

Los principales fenómenos bioquímicos que afectan a los componentes de los embutidos crudos curados durante la maduración son la fermentación de los carbohidratos, las reacciones de curado, las degradaciones que afectan a los lípidos (lipólisis y oxidación lipídica) y a las proteínas (proteólisis). A continuación se describirá brevemente cada uno de estos fenómenos excepto el último que, por estar estrechamente relacionado con el tema de esta tesis, se abordará más ampliamente en el apartado I.4.4.

I.4.1. Fermentación de carbohidratos: producción de ácido láctico.

La fermentación de los hidratos de carbono se produce con mayor intensidad en las primeras fases de maduración y se origina por la acción de las bacterias lácticas presentes en el embutido de forma natural o añadidas intencionadamente, dando lugar principalmente a ácido láctico. La acumulación de este ácido provoca un descenso del pH que inhibe el desarrollo de microorganismos no deseables, acelera el proceso de deshidratación al disminuir la capacidad de retención de agua de las proteínas musculares, gobierna las reacciones enzimáticas e influye en la formación del color y en su estabilidad. El ácido

láctico, por otra parte, contribuye al sabor de los embutidos, sobre todo los de maduración corta (De Keteleare y col., 1974; Lücke, 1986).

La fermentación de los carbohidratos en los embutidos madurados se puede realizar de dos formas: por la vía homoláctica (ruta de Embden-Meyerhof) y la heteroláctica (ruta de los fosfatos de pentosas o de Warburg-Dickens), pero en los embutidos predomina la primera, dado que son los lactobacilos homofermentativos los que siempre prevalecen. Además de por estas dos rutas, los azúcares se pueden degradar aeróbicamente (por los micrococcos o, si están presentes en tasas elevadas, por las bacterias Gram-negativas) siempre que exista una alta concentración de oxígeno en la pasta, dando como productos finales CO_2 y H_2O (DeKeteleare y col., 1974; Demeyer y col., 1986). Sin embargo, dado que la flora láctica es la mayoritaria (del orden de dos unidades de magnitud superior al valor que alcanzan las micrococáceas (Palumbo y Smith, 1977; Sanz y col., 1988; Selgas y col., 1988), la gran mayoría de los carbohidratos se transforman en ácido láctico.

Aparte de ácido láctico, pueden producirse también a partir de los carbohidratos pequeñas cantidades de acético y muy pequeñas, pero significativas, de propiónico y butírico (DeKeteleare y col., 1974) procedentes de las rutas heterofermentativas. La presencia de otras sustancias, como etanol y ácido pirúvico ha sido constatada por Pezacki y Szostak (1962). También se han encontrado pequeñas cantidades de acetoína, butanodiol y diacetilo originados por el metabolismo de lactobacilos y micrococáceas (Pyrz y Pezacki, 1975). Algunos autores (Halvarson, 1973; Cantoni y col., 1985) han señalado que todas estas sustancias procedentes de degradación de los azúcares influyen en el sabor y aroma de los embutidos. Sin embargo, este aspecto está aún por comprobar, ya que estas sustancias se producen en pequeña cantidad y su efecto podría quedar enmascarado por otros compuestos (Deibel, 1974).

I.4.2. Efecto de los nitritos.

Son tres los efectos bioquímicos principales de los nitritos en los productos curados: ocasionan el color rosado-violáceo típico de los productos curados (Demasi y col., 1989), desarrollan un aroma específico (Brown y col., 1974) diferente del de los productos a los que no se añaden estos compuestos (Lücke, 1984) y, finalmente, el nitrito posee capacidad antioxidante, constatada por numerosos autores (Younathan y Watts, 1959; Greene y Price, 1975; MacDonald y col., 1980), que obtuvieron valores del índice TBA menores en productos a los que se había añadido nitrito.

Las sales de curado comercializadas contienen normalmente, además de NaCl, una mezcla de nitrato y nitrito sódico, aunque en algunos embutidos de maduración larga se emplean sólo nitratos. Dado que el compuesto activo es el óxido nítrico, los nitratos y nitritos deben reducirse por acción de los microorganismos del producto, principalmente micrococos y estafilococos (Zaika y col., 1976; Palumbo y Smith, 1977), por lo que es necesario controlar la formación de ácido láctico, ya que el crecimiento de las micrococáceas se inhibe a pH ácido, manteniendo sus valores por encima de 5,4 hasta que se haya reducido suficiente cantidad de nitratos y nitritos (Niinivaara, 1955). Este fenómeno tiene lugar en las primeras 24-48 horas de la fase de fermentación.

El pigmento del curado se forma, básicamente, por la unión del óxido nítrico (NO) con el grupo hemo de la mioglobina (Mb) para originar finalmente nitrosomioglobina (NOMb). Por ello es necesario que se produzca previamente la reducción del nitrito a NO. Sólo la Mb como tal puede unirse al NO directamente. Sin embargo, todos los productos cárnicos picados contienen oximioglobina (OMb), ya que la Mb entra en contacto y se une al oxígeno del aire en la superficie de la carne. En presencia de nitrito, el átomo de hierro pasa de la forma divalente a la trivalente dando lugar a metamioglobina (MetMb), de color pardo (Toth, 1983). Las transformaciones posteriores de MetMb a NOMb han sido descritas de diversas maneras por diferentes autores. Walters y col. (1967) proponen que la MetMb se

forma por oxidación de la Mb por el nitrito. Como paso intermedio se forma nitrosometamioglobina, que es reducida a su vez a NOMb en las mitocondrias. Möhler (1984) describe otro modelo en el que todos los compuestos derivan de la MetMb; ésta es reducida por grupos SH, por los coenzimas NADH y FMN o FAD, o bien por un sistema deshidrogenasa NADH-dependiente junto con ferrocitocromo-C.

En general, se considera que los nitritos son estabilizantes del color pero su capacidad de producir dicho color de curado ha sido discutida por algunos autores. Wirth (1973) señala que los embutidos fabricados sin nitrato ni nitrito presentan color grisáceo, muy distinto del color rosado-violáceo típico. Por otra parte, Cassens y col. (1979) opinan que los nitritos no proporcionan color a la carne curada sino que cooperan en la estabilización del color. Sin embargo, Toth (1983) y, más recientemente, Goutefongea (1991) consideran al nitrito como un productor del color de curado.

La contribución de los nitritos al sabor de los productos cárnicos fue descrita hace ya bastante tiempo (Brooks y col., 1940) y corroborada posteriormente por numerosos autores en distintos tipos de embutidos. Así, Simon y col. (1973) y Hustad y col. (1973) observaron una mayor aceptabilidad en las pruebas sensoriales de salchichas tipo Francfort a las que se les había añadido nitritos. Similares resultados obtuvieron Mottram y Rhodes (1973) con bacon, llegando a la conclusión de que los productos responsables del sabor no aparecían hasta que el nitrito reaccionaba con los componentes de la carne. Igualmente, Skjelkvåle y col. (1974) observaron, en embutidos fermentados, una potenciación del sabor después de 3 meses de maduración. La modificación del sabor se logra con cantidades pequeñas de nitrito (25 ppm), pero si las dosis son muy elevadas (300 ppm) se origina la aparición de un sabor anómalo, posiblemente debido a fenómenos de oxidación (Touraille y Goutefongea, 1985).

La contribución de los nitritos al sabor se ha demostrado con análisis sensoriales, pero aún no se han identificado los componentes responsables ni el mecanismo por el que los nitritos ejercen su acción. Existen múltiples hipótesis que tratan de explicar este hecho. Algunos autores (Fooladi y col., 1979; Igene y col., 1979; Chen, 1982) lo atribuyen a su

efecto antioxidante y en otros trabajos (Bailey y Swain, 1973; Mottram y col. 1984) se han tratado de identificar los compuestos volátiles responsables del sabor. Cross y col. (1965) detectaron mayor cantidad de carbonilos en jamones fabricados sin nitrito. Otros autores (Cho y Batzler, 1970; Gray y Pearson, 1984) señalan que el nitrito podría interaccionar con otros componentes tisulares dando lugar al sabor característico, habiéndose atribuido (Toth, 1983) a la reacción del nitrito con distintos aminoácidos, como lisina, tirosina o triptófano. Debido a la gran cantidad de compuestos volátiles aislados de las carnes curadas, no es fácil determinar si la variación del sabor se debe a la presencia de un compuesto, a su ausencia o bien a la modificación de las proporciones de las sustancias detectadas (Goutefongea, 1991). Según Bailey y Swain (1973) podría deberse incluso a la ausencia de algunos "off-flavors" presentes en embutidos sin nitrito.

En cuanto a la capacidad antioxidante de los nitritos se han sugerido distintos mecanismos. Westerberg (1973) apunta que el nitrito, al reaccionar con el hierro hemínico, lo mantiene en forma Fe^{2+} disminuyendo la probabilidad de su presencia en forma Fe^{3+} , que tiene un mayor efecto prooxidante. Sin embargo, el fenómeno parece ser más complejo, de tal forma que Gray y Pearson (1987) proponen una serie de mecanismos alternativos: formación de un complejo entre los pigmentos hemo y el nitrito que prevendría la liberación de hierro ferroso, el cual tiene un efecto catalítico sobre la oxidación lipídica; estabilización de los lípidos insaturados de las membranas; acción quelante sobre iones metálicos, como los ferrosos, con lo que no están disponibles como catalizadores de las reacciones de oxidación. Estas tres posibilidades influirían en la inhibición de la oxidación, aunque, según dichos autores, la primera pudiera ser la más importante.

I.4.3. Lipolisis y oxidación lipídica.

La grasa es, junto con la carne, el componente mayoritario de los embutidos fermentados. El conjunto de cambios que se produce en la fracción lipídica durante la

maduración es uno de los factores más importantes en la formación del sabor y aroma característicos de estos productos cárnicos (Demeyer y col., 1974; DeKeteleare y col., 1974; Dierick y col., 1974). Estos cambios pueden ser de dos tipos: hidrolíticos y oxidativos. Según Cerise y col. (1973) la lipólisis se inicia durante la fase de fermentación, originando ácidos grasos libres que se transforman, vía fenómenos autooxidativos, en carbonilos y otras sustancias durante la fase de secado.

Se ha indicado que los cambios hidrolíticos en la grasa de los embutidos fermentados se deben fundamentalmente a la acción de las lipasas bacterianas (Cantoni y col., 1967; Palumbo y Smith, 1977; Nieto y col., 1989), aunque en los primeros momentos de la fermentación se puede producir hidrólisis debida a la actividad de lipasas tisulares (Wallach, 1968; Lücke, 1984). De hecho, en una investigación reciente (García y col., 1992) en la que se utiliza un método aséptico para elaborar embutidos experimentales (Ordóñez y col., 1989), se indica que las lipasas musculares pueden desempeñar un papel primordial, debido a que se observa un incremento similar de la tasa de ácidos grasos tanto en embutidos inoculados como en los elaborados asépticamente.

Las micrococáceas son los microorganismos que, en general, se han considerado como los principales agentes responsables de la lipólisis, dado que repetidas veces se han demostrado en ellos actividades lipolíticas (Selgas y col., 1986; Lücke y Hechelman, 1987; Talon y col., 1992; Montel y col., 1993). Los lactobacilos presentan también actividad lipolítica, pero no parece ser muy marcada (Parejo y col., 1979; Sanz y col., 1988). En levaduras y mohos aislados de los embutidos se ha detectado también actividad lipolítica (Leistner y Bem, 1970; Comi y Cantoni, 1980; Kilara, 1985a), por lo que estos microorganismos pudieran también estar implicados en la hidrólisis lipídica.

Durante la maduración, la tasa de ácidos grasos libres se incrementa (Lu y Townsend, 1973), observándose aumentos mayores en las zonas más externas, sobre todo en embutidos que presentan mohos superficiales y en etapas tardías de la maduración (Mihalyi y Kormendy, 1967). Se produce, por otra parte, una mayor liberación de ácidos grasos

insaturados, como linoleico y oleico, frente a los saturados, como palmítico y esteárico (Cerise y col., 1973; Demeyer y col., 1974; Melgar y col., 1990). En algunos casos se ha llegado a observar una disminución de estos últimos (Melgar y col., 1990). Esta particularidad puede atribuirse a la especificidad posicional y/o estructural de las lipasas microbianas (Alford y col., 1971).

La cantidad de ácidos grasos libres generados no parece relacionarse directamente con la duración del período de maduración, sino que está determinada por el tipo de microflora que se desarrolla en el embutido durante la fase de fermentación y el inicio del secado (Acton, 1978).

Los ácidos grasos insaturados liberados durante la fase anterior sufren posteriormente oxidaciones que dan lugar a la formación de peróxidos y estos, a su vez, a carbonilos (Cerise y col., 1973). En los embutidos, la formación inicial de los peróxidos es fundamentalmente de origen microbiano (Lamanna y Mallette, 1965), detectándose las máximas concentraciones durante la fase de fermentación (Cerise y col., 1972). Tanto las micrococáceas como los lactobacilos producen peróxidos. Sin embargo, en aquellos embutidos que contienen elevadas tasas de micrococáceas (bacterias catalasa positivas) decrece el contenido, mientras que en los que sus niveles son más bajos se mantienen los altos valores iniciales de peróxidos (Nurmi, 1966).

Acton (1978) considera tres factores que, asociados, contribuyen a la oxidación de los ácidos grasos después de la lipólisis: incremento del contenido en peróxidos a consecuencia del metabolismo microbiano, aumento de la concentración de NaCl durante el proceso de secado (consecuencia de la pérdida de agua) y descenso del pH del embutido hasta unos valores aproximados de 4,8-5,0. El efecto prooxidante de la sal se atribuye en parte a su capacidad de desplazar los iones hierro de las macromoléculas para que intervengan en las reacciones de oxidación. Esta hipótesis se sustenta en que su efecto es inhibido por el EDTA (Kanner y col., 1992).

Realmente, son muchos los factores y agentes que influyen en la oxidación de los

lípidos de la carne (Kanner y col., 1992); entre ellos cabe citar la composición y frescura de la carne, la temperatura de procesado y almacenamiento (el calor ocasiona la liberación de oxígeno a partir de la oximioglobina, produciendo H_2O_2 (Harel y Kanner, 1985); asimismo, el nivel de hierro libre aumenta durante el calentamiento, debido a la elevada producción de H_2O_2 que rompe la estructura de la porfirina liberando hierro (Rhee y col., 1987; Harel y col., 1988), destrucción de la estructura del músculo y el tejido adiposo mediante el picado o la emulsión, que conlleva una mayor exposición de los fosfolípidos al oxígeno (Igene y Pearson, 1979; Khayat y Schwall, 1983), y la adición de otros compuestos, como nitritos, especias y antioxidantes (ácido ascórbico), además de la sal antes mencionada. También se deben tener en cuenta los compuestos antioxidantes que contiene el humo, en el caso en que se realice el ahumado durante la fabricación del producto.

La oxidación lipídica da lugar a una gran variedad de productos finales, como carbonilos, hidrocarburos, furanos, etc., siendo los primeros los compuestos más importantes en el desarrollo del sabor y aroma de los embutidos y también los más numerosos de la fracción volátil (McDougall y col., 1975; Mottram y col., 1984; Berdagué y col., 1993). Los compuestos carbonilo se acumulan tanto durante la fase de fermentación como en la de maduración, aunque sus orígenes difieren en cada fase. En la primera proceden de la fermentación de los carbohidratos y en la segunda de la oxidación de los ácidos grasos (Cerise y col., 1973; Demeyer y col., 1974). Otros autores apuntan una tercera posibilidad de formación de carbonilos a partir de los aminoácidos, vía la reacción de Strecker (Halvarson, 1973; Lücke, 1986). Se ha aislado gran cantidad de compuestos carbonilos a partir de productos curados. Según algunos autores (Nestorov y col., 1982), los más abundantes suelen ser las metilcetonas y los menos los aldehídos, aunque estos son más variados. Sin embargo, Langner y col. (1970) identificaron 29 compuestos carbonilos a partir de salami seco, de los cuales el formaldehído y el acetaldehído estaban presentes en mayor proporción. Berdagué y col. (1993) identificaron 78 compuestos volátiles relacionados con el sabor y

aroma de los embutidos, de los cuales 11 eran aldehídos y 11 cetonas.

I.4.4. Cambios en las proteínas y proteolisis.

Durante la maduración de los embutidos, las proteínas y, en general, los compuestos nitrogenados sufren una serie de transformaciones debidas tanto a la acción de los microorganismos como a factores propios de la carne y a la tecnología aplicada durante la fabricación del producto. Ya hace tiempo que se observó un aumento progresivo de la fracción nitrogenada no proteica a lo largo del proceso madurativo hasta llegar a valores superiores al 20% del nitrógeno total (Niinivaara y col., 1961; Mihalyi y Körmendy, 1967). Este hecho, junto con otros factores, conforman las características sensoriales del embutido, como la textura y el sabor y aroma característicos del producto fermentado.

Los factores que, conjuntamente, determinan los cambios de las sustancias nitrogenadas en los embutidos son los siguientes:

I.4.4.1. FACTORES TECNOLOGICOS.

Durante el picado de la carne se produce una ruptura más o menos intensa de las fibras musculares, con lo que las proteínas miofibrilares, que constituyen el 83 % del contenido celular (Offer, 1984), quedan expuestas a la acción de la sal. La presencia de sal facilita los procesos electrostáticos implicados en la formación de la película proteica que rodea los glóbulos grasos y favorece el establecimiento de interacciones proteína-grasa y proteína-proteína. Los iones reaccionan con las cargas de las proteínas y reducen la atracción electrostática entre las cargas opuestas de grupos próximos, facilitando el desdoblamiento y la disociación. En fin, se están creando las condiciones para la formación de una red tridimensional decisiva para la estabilidad de la textura de estos productos (Katsaras y Budras, 1992).

A lo largo del período de fermentación, el NaCl, el aumento de la temperatura

(22-26°C) y el descenso del pH provocan la insolubilización de las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares (Wardlaw y col., 1973; Klement y col., 1974). La insolubilización continúa en el período de maduración. Aunque el pH detiene su descenso e incluso aumenta ligeramente hacia el final (Lücke, 1984) y la temperatura es inferior (11-15°C), la deshidratación se prolonga debido a la baja humedad relativa del entorno, ocasionando una disminución de la interacción proteína-agua y dificultando la solubilización (Kenney y Hunt, 1990). Esto conlleva un incremento de la concentración de NaCl que contribuye, por su elevada fuerza iónica, a la desnaturalización de las proteínas de la carne, especialmente las miofibrilares, produciendo cambios profundos en su estructura (Knight y Parsons, 1988). Las proteínas disueltas por efecto del picado y la adición de sal dan lugar a agregados en forma de filamentos que interaccionan entre sí, lo que contribuye a la estabilidad del gel.

I.4.4.2. CAMBIOS DE LAS PROTEINAS Y COMPUESTOS NITROGENADOS DE LOS EMBUTIDOS A LO LARGO DE LA MADURACION.

I.4.4.2.1. Origen de las proteasas y peptidasas presentes en los embutidos.

Los cambios en los compuestos nitrogenados de los embutidos durante el período madurativo se deben principalmente a la actividad de proteasas y peptidasas de origen microbiano y muscular.

Muchos microorganismos poseen la capacidad de producir enzimas extra e intracelulares capaces de atacar a proteínas y péptidos (Bacus, 1986). En general, las bacterias no pueden utilizar las proteínas presentes en el medio; es necesario que sufran previamente una degradación a péptidos y aminoácidos hasta formar moléculas de un tamaño adecuado para que sea posible su transporte al interior de la célula. Posteriormente, los péptidos son degradados a aminoácidos libres por peptidasas intracelulares (Law, 1980).

En los embutidos fermentados, las bacterias lácticas han sido consideradas por algunos autores (Reuter y col., 1968; Dierick y col., 1974; Guo y Chen, 1991) como los

principales microorganismos proteolíticos. Sin embargo, Kitchell y Shaw (1975) y Law y Kolstad (1983) han señalado que la actividad proteolítica de la flora láctica es débil y otros autores (Nordal y Slinde, 1980; Lücke y Hechelmann, 1987; Montel y col., 1992) han puesto de manifiesto que distintas especies de bacterias lácticas, utilizadas como cultivos iniciadores, no poseen actividad proteolítica alguna. Montel y col. (1992) han señalado que las bacterias lácticas pueden contribuir al incremento de aminoácidos libres debido a peptidasas intracelulares. Por lo que se refiere a la degradación de aminoácidos y dipéptidos, Cantoni y col. (1975) observaron que los lactobacilos pueden hidrolizar la carnosina y descarboxilar la tirosina, histidina y triptófano, dando lugar a las aminas correspondientes durante la maduración del salami.

Similar controversia gira en torno a las micrococáceas. Sajber y col. (1971), Lücke (1986) y Donham y col. (1988) han señalado que estos microorganismos son proteolíticos. Selgas (1985) observó que algunas cepas aisladas de chorizo presentaban actividad proteolítica pero otras no; Comi y col. (1992) también detectaron una buena actividad proteolítica sólo en algunas cepas obtenidas de salami italiano. El incremento de los aminoácidos libres y de la proteólisis en los embutidos fermentados ha sido atribuida a los micrococos por varios autores (Sajber y col., 1971; Bacus, 1986; Guo y Chen, 1991). Recientemente, Selgas y col. (1993) observaron en varias cepas de micrococos aisladas de embutidos españoles la existencia de actividad proteolítica tanto intra como extracelular, siendo en la mayoría de los casos más intensa la primera que la segunda. Sin embargo, Niinivaara y col. (1964) no encontraron diferencias en el contenido de aminoácidos libres entre embutidos fermentados de forma natural y otros inoculados con micrococos. Giolitti (1960) opina que la actividad microbiana es pequeña y que la proteólisis se debe principalmente a la acción de las enzimas propias de la carne. Más recientemente, Montel y col. (1992) detectaron sólo una ligera actividad aminopeptidásica en especies del género *Staphylococcus* y ninguna actividad proteinásica.

Los mohos que cubren la superficie de algunos embutidos fermentados también

producen proteinasas, sobre todo cuando hay pocos nutrientes disponibles. Geisen y col. (1992) han comprobado, además, que cepas de *Penicillium nalgiovense* con diferente actividad proteolítica dan lugar a aromas distintos en embutidos curados. Las levaduras, tanto las presentes en el interior del producto como las que forman parte de la flora superficial, presentan también actividad proteolítica (Woods y Kinsella, 1980; Lücke, 1986), aunque algunos autores aseguran que no es muy acusada (Comi y Cantoni, 1980, 1983).

Las proteasas endógenas inducen una serie de cambios estructurales y transformaciones bioquímicas de las proteínas sarcoplásmicas, miofibrilares y del tejido conectivo en la carne fresca, dando lugar a una serie de modificaciones de las propiedades sensoriales, siendo la principal el ablandamiento (Asghar y Bhatti, 1987). Verplaetse y col. (1989) señalan que los embutidos constituyen un medio óptimo para la actividad de las catepsinas, dado su bajo pH y las temperaturas utilizadas durante su procesado. El hecho de que las catepsinas se encuentren dentro de los lisosomas no parece suponer un obstáculo para su actividad, como puede suceder en la proteólisis *postmortem* del músculo (Koochmaraie, 1992). Durante la fabricación de embutidos fermentados tipo salchichón o salami, se realiza un picado más o menos fino que rompe las fibras musculares y, posiblemente, favorece la liberación de estas proteasas. Astiasarán y col. (1990a) detectaron menor actividad proteolítica en chorizos de picado grueso que en los de picado fino, atribuyéndolo a la mayor dificultad de actuación de las enzimas proteolíticas en los primeros.

Pezacki y Pezacka (1986) observaron dos clases de sistemas proteolíticos aislados de embutidos fermentados: un sistema catepsina y un sistema que denominaron peptidasas similares a la tripsina por su capacidad de hidrolizar un sustrato desnaturalizado, que presentaba una actividad mayor que el primero. Sin embargo, no identificaron el grupo de peptidasa al que pertenecen. En un trabajo previo señalaron que se observó un incremento en el contenido de serina, treonina, cisteína y tirosina libres debido a la acción de estas enzimas (Pezacki y Pezacka, 1980).

I.4.4.2.2. Cambios en los componentes nitrogenados.

Las condiciones que reinan en el embutido (concentración de sal, pH, actividad de agua, etc) dan lugar a la insolubilización de las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares (Acton, 1978). Wardlaw y col. (1973) observaron un aumento de la concentración de proteína insoluble de un 36%, debido a su desnaturalización durante la fermentación y maduración. Klement y col. (1973) señalaron un descenso en la solubilidad de las proteínas miofibrilares del 50-60% y de un 24-47% en las sarcoplásmicas durante la fase de fermentación en embutidos americanos. Las proteínas sarcoplásmicas se insolubilizaron en menor extensión y más lentamente que las miofibrilares debido al pH, y a la concentración de sal, a lo que no fue ajena la elevada temperatura de fermentación (Klement y col., 1974, 1975).

En embutidos fermentados de tipo europeo, en los que la temperatura durante la fabricación no excede de 22°C, las pérdidas de solubilidad son similares en los dos tipos de proteínas durante los primeros 10 días (Mihalyi y Körmendy, 1967; DeKeteleare y col., 1974). Sin embargo, Astiasarán y col. (1990b) han encontrado una mayor insolubilización en las proteínas sarcoplásmicas que en las miofibrilares en salchichón y salami, mientras que en el caso del chorizo las dos clases de proteínas se veían afectadas de igual forma, lo que les permitió concluir que el grado de insolubilización depende también del tipo de embutido. Similares resultados obtuvo Dominguez (1988) en el chorizo, con descensos del 40-68% y 54-63% en la solubilidad de las proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas, respectivamente, tras 45 días de maduración.

El proceso de insolubilización continúa durante la fase de maduración, aunque en los embutidos europeos una parte de las dos fracciones proteicas siempre permanece soluble (Mihalyi y Körmendy, 1967; DeKeteleare y col., 1974). Algunos autores han observado a lo largo de este período una agregación de las proteínas miofibrilares con formación de enlaces disulfuro (Sokolov y Tchekovskaya, 1971) y un incremento del contenido de grupos sulfhidrilo (Sandholm y col., 1972). Astiasarán y col. (1990a) detectaron una disminución de

la concentración de estos grupos sulfhidrilo a lo largo de la maduración del chorizo, la que atribuyeron a su intervención en la gelificación de la masa del embutido.

La insolubilización de las proteínas de la carne contribuye al desarrollo de la textura y firmeza características de los embutidos crudos curados, aunque el endurecimiento también está relacionado con el tiempo de secado, contenido en humedad, diámetro y forma de picado (Wardlaw y col., 1973; Keller y col., 1974).

La proteólisis implica un descenso de la cantidad de proteínas de elevado peso molecular y un incremento de las fracciones nitrogenadas de tamaño inferior. De esta forma, Verplaetse y col. (1989) han señalado un aumento de la concentración de polipéptidos con un peso molecular inferior a 36000 d. de un 75,9% durante la maduración, mientras que la cadena pesada de la miosina disminuyó en un 49% y la actina y la troponina T en un 30%. Similares resultados obtuvieron Garriga y col. (1988) y García de Fernando y Fox (1991) en diversas proteínas de la carne durante la maduración, describiendo una degradación notable de éstas y un aumento de la concentración de péptidos de medio y bajo peso molecular. Garriga y col. (1988) detectaron un mayor descenso en las proteínas citoplasmáticas, más accesibles al ataque enzimático.

Las diferentes fracciones nitrogenadas que forman parte del nitrógeno no proteico en los embutidos han sido estudiadas por numerosos autores: Wardlaw y col., 1973; Reuter y Lagner, 1968; Dierick y col., 1974; Cantoni y col., 1985; Ferrer y Arboix, 1986b; Garriga y col., 1986; García de Fernando y Fox, 1991, etc. Dierick y col. (1974) observaron que, al principio de la maduración, la principal fracción nitrogenada no proteica eran los péptidos, mientras que los aminoácidos libres predominaban al final del proceso. La tasa de aminoácidos libres aumentaban más rápidamente que las del nitrógeno amoniacal y el peptídico, aunque el amoniaco incrementaba su ritmo de producción durante el período de secado mientras que el de péptidos decrecía. Los aminoácidos libres que mostraron mayor incremento de su concentración fueron la alanina, leucina, valina, serina, glicina y prolina, existiendo además un aumento de los productos de descarboxilación de ciertos aminoácidos

para rendir aminas (histamina, tiramina y putrescina). También observaron un descenso de la concentración de nucleótidos y un aumento de la de nucleósidos y bases nitrogenadas.

Por otra parte, León Crespo y col. (1985) encontraron, al final de la maduración, incrementos en el nitrógeno no proteico de 1,35 veces respecto tanto a la materia seca como al nitrógeno total. Estos autores opinan que la evolución de esta fracción respecto al tiempo se ajusta a una curva de tipo logarítmico, lo que difiere de la evolución descrita por otros autores. Así, los resultados obtenidos por Garriga y col. (1988) muestran un aumento en los primeros días de la maduración, seguido de una inflexión a las 72 horas de fermentación y un ligero incremento de los niveles hasta el final de la maduración. El nitrógeno soluble experimentó un descenso mayor a las 96 horas y se mantuvo posteriormente, mientras que el amoníaco presentó un fuerte aumento a las 72 horas, estabilizándose después. García de Fernando y Fox (1991) tampoco observaron una evolución logarítmica en las fracciones que determinaron (nitrógeno soluble en agua, soluble en ácido fosfotúngstico y aminoácidos libres), sino un incremento acusado hasta los 20 días de maduración y luego más moderados.

En embutidos americanos, Wardlaw y col. (1973) observaron un incremento del 60% aproximadamente en el contenido de nitrógeno no proteico después de un calentamiento a 63°C. Por otra parte, Klement y col. (1973) sólo detectaron un ligero aumento de esta fracción en embutidos calentados a 55°C. Más recientemente, DeMasi y col. (1990) han descrito, en embutidos americanos, incrementos del nitrógeno no proteico similares a los obtenidos en embutidos de tipo europeo (Dierick y col., 1974) aunque en un tiempo de secado menor, debido, según ellos, al uso de temperaturas elevadas durante la fermentación. El aumento fue marcado durante este período y muy ligero en la fase de maduración. Estos mismos autores señalaron incrementos de más de 5mg/100g de extracto seco en 14 de los 20 aminoácidos determinados, mientras que observaron descensos notables en la concentración de arginina, cisteína y glutamina. Reuter y col. (1968), en embutidos europeos, observaron incrementos mayores en todos los aminoácidos, produciéndose la mayor liberación durante la fermentación y primeros días de maduración, particularmente en ácido glutámico, alanina,

leucina, histidina y metionina. Entre los días sexto y vigesimotercero los aumentos fueron menores e, incluso, existió una leve tendencia al descenso en algunos casos, para volver a subir los niveles, posteriormente, al final de la maduración. Por otra parte, Cantoni y col. (1974) describieron distintas evoluciones de la concentración de aminoácidos libres en dos tipos de salami, aunque en ambos casos se produjo una disminución del contenido de ácido glutámico, asparagina, ornitina y arginina y la desaparición de tirosina, que era descarboxilada a tiramina.

Existen múltiples factores que influyen en la concentración final de nitrógeno no proteico (pH, grado de picado, tipo de embutido, etc). Lois y col. (1987) estudiaron el efecto de la adición de carbohidratos a los embutidos y, por lo tanto, del pH en la proteólisis. Tanto en el lote con hidratos de carbono (pH más bajo) como en el que no los contenía (pH más elevado) la fracción nitrogenada no proteica fue aumentando, pero el valor fue 1,65 veces mayor en el primero y sólo 1,24 veces en el segundo. Estos resultados coinciden con lo observado por Klement y col. (1974), quienes afirmaron que los valores de pH bajos estimulaban de forma acusada la hidrólisis de las proteínas miofibrilares, aunque sólo ligeramente la de las sarcoplásmicas. Astiasarán y col. (1990a) obtuvieron incrementos mayores del nitrógeno no proteico en chorizos de picado fino que en los de picado grueso debido, según dichos autores, a la mayor liberación de enzimas proteolíticas endógenas, aunque también presentaron una bajada más acusada del pH. También se han detectado diferencias en la proteólisis entre distintos tipos de embutidos. Así, Astiasarán y col. (1990b) detectaron cantidades de nitrógeno no proteico y de aminoácidos libres mayores en el chorizo que en salchichón y salami, los cuales mostraron valores similares entre sí y un índice de proteólisis un 2% inferior al de aquél.

Finalmente, los aminoácidos libres sufren una serie de reacciones de degradación, como desaminaciones y descarboxilaciones, produciéndose compuestos como cetoácidos, ácidos grasos, amoniaco y aminas. La concentración de aminas de los embutidos tiene importancia no sólo por su efecto en el sabor, sino también desde el punto de vista sanitario,

dado que una cantidad excesiva de aminas biógenas en los alimentos puede constituir un problema para la salud del consumidor; son especialmente peligrosas para pacientes tratados con inhibidores de la monoaminooxidasa. Afectan a la presión sanguínea (tiramina e histamina) y tienen la capacidad de desencadenar migrañas en pacientes sensibles (tiramina y 2-feniletilamina) (Hanington, 1967; Sandler y col., 1974). Las cantidades capaces de producir toxicidad son muy variables, oscilando en la tiramina entre 10 y 80 mg y en la histamina entre 70 y 1000 mg (Renner, 1987).

Las rutas más probables de formación de aminas en embutidos crudos curados son dos:

a) Descarboxilación de aminoácidos: esta vía da lugar sobre todo a la formación de poliaminas, aunque también produce algunas monoaminas, tal como la propilamina a partir de metionina (Smith, 1970). Así, se forman la cadaverina a partir de la lisina y la espermidina de la metionina; de la misma manera, la histidina y la tirosina dan lugar a histamina y tiramina, respectivamente (Tabor y col., 1958; Tabor y Tabor, 1964; Blackwell y Mabbit, 1965; Dierick y col., 1974).

b) Aminación de aldehidos: esta vía parece ser la principal en la formación de monoaminas en alimentos (Maier, 1970). Siguiendo esta ruta, el hexanal rinde hexilamina, el acetaldehído etilamina, etc. (Hartmann, 1967).

Existen otras vías de formación de aminas en alimentos, tales como la transformación de óxido de trimetilamina en trimetilamina, la descomposición de fosfolípidos o la descomposición térmica de aminoácidos, pero son propias de otros alimentos distintos de los embutidos (Maga, 1978).

En los productos cárnicos se han detectado diversas aminas, tales como histamina, tiramina, triptamina, feniletilamina, putrescina y cadaverina (Dierick y col., 1974; Vandekerckhove, 1977), espermina y espermidina (Spinelli y col., 1974). Dierick y col. (1974) describieron incrementos de al menos 10 veces en la concentración de histamina, tiramina y putrescina en los primeros días de maduración, tasas que continuaron aumentando

hasta el final del proceso junto a un descenso de la concentración de los aminoácidos precursores. Estos resultados contradicen los obtenidos previamente por Reuter y col. (1968) y Langner (1969), quienes observaron un incremento de los tres aminoácidos. Vandekerckhove (1977) señala que la amplia variación detectada en la concentración y composición de aminas puede verse influida por las condiciones de fermentación del embutido y por la actividad de la flora específica de estos productos.

Los aminoácidos y, en general, los productos de degradación de las proteínas contribuyen al sabor de los embutidos crudos curados, aunque su grado de influencia ha sido discutido por distintos autores. Tanto en péptidos como aminoácidos libres están presentes los cuatro sabores primarios: dulce, salado, ácido y amargo, además de un quinto sabor, el "umami", considerado también por algunos investigadores como primario (Nishimura y Kato, 1988). Este término se utiliza para describir ciertos sabores que se caracterizan por ser sabrosos, succulentos y deliciosos (Baines y Mlotkiewicz, 1984) y que no pueden reproducirse mezclando los otros sabores básicos. Los aminoácidos libres en estado puro presentan sabores fácilmente clasificables. La mayoría de las formas L muestran gusto amargo, aunque algunos, como la alanina, glicina o serina, son dulces (Kato y col., 1989). Se han citado varios compuestos poseedores de sabor "umami", todos ellos aminoácidos o 5'-ribonucleótidos (Boudreau y col., 1979). En la carne los principales son el ácido glutámico, guanosina-5'-monofosfato (GMP) e inosina-5'-monofosfato (IMP). La mezcla del primero con un ribonucleótido produce un efecto sinérgico en el sabor (Yamaguchi, 1967). Si a dicha mezcla se le añaden otros aminoácidos como alanina, cisteína, histidina, metionina, prolina, valina o glicina, el efecto antes mencionado se potencia (Tanaka y col., 1969, citado por Nishimura y Kato, 1988).

Aunque el papel de todos estos compuestos en el sabor de los embutidos no está bien caracterizado, sí que se han observado modificaciones en el sabor de otros productos obtenidos a partir de proteínas musculares. Así, Nishimura y Kato (1988), en su estudio sobre el sabor de caldos preparados con carne antes y después de un período de

almacenamiento, concluyeron que el aumento en aminoácidos libres y péptidos contribuye al incremento del sabor a carne. Cambero y col. (1992) observaron en caldos de carne una correlación significativa entre la temperatura de calentamiento y la concentración de aminoácidos libres, carnosina e IMP, concluyendo que la mezcla de aminoácidos libres, péptidos de bajo peso molecular (menor de 300 daltons) e IMP jugaban un papel importante en la intensidad de sabor de dichos caldos. También se han detectado péptidos con sabor "umami" procedentes de proteínas musculares de pescado hidrolizadas con pronasa (Noguchi y col., 1975) y en carne de ternera tratada con papaína (Yamasaki y Maekawa, 1978).

Los aminoácidos pueden dar lugar también a compuestos responsables del sabor y aroma en los embutidos de manera indirecta, mediante la degradación de Strecker. En esta ruta, los α -aminoácidos son fragmentados por compuestos carbonilo y otros agente oxidantes, dando como productos finales CO_2 , aldehídos, amoniac y otros compuestos (Davídek y col., 1990). Aunque esta reacción se produce generalmente a temperaturas elevadas (unos 90°C), es posible que una cantidad considerable de aminoácidos libres originados por una proteolisis muy intensa, unido a una baja actividad de agua, puedan facilitar esta degradación (Barbieri y col., 1992). Así, la presencia de algunos aldehídos de cadena ramificada en jamones curados, como el 2 y 3-metilbutanal, ha sido atribuida a esta reacción (García y col., 1991; Barbieri y col., 1992). Ventanas y col. (1992) señalan la posible influencia de los compuestos resultantes de estas reacciones en el sabor y aroma de estos productos.

La proteolisis influye también de forma manifiesta en la modificación de las propiedades nutritivas de los embutidos, ya que aumenta la digestibilidad tanto de las proteínas como la de los aminoácidos considerados individualmente. Eskeland y Nordal (1980) observaron un incremento de la digestibilidad de la proteína más del 90%. El mayor aumento de digestibilidad en los aminoácidos se registró para la treonina, seguido de la metionina, así como para algunos aminoácidos no esenciales (alanina, glicina, prolina y ácido

aspártico).

I.5. USO DE ENZIMAS EN LA FABRICACION DE ALIMENTOS.

Desde tiempos remotos, el hombre ha observado cambios en las cualidades de los alimentos, como la maduración de las frutas, el ablandamiento y mejora del sabor de la carne durante el almacenamiento, la precipitación de la leche y su transformación en yogur o queso, etc. Igualmente, ha aprovechado dichos cambios para obtener otros productos distintos de la materia prima inicial, como queso, vinos, cerveza o embutidos. Todas estas modificaciones beneficiosas se producen merced a la intervención de enzimas de tres procedencias: las normalmente presentes en el alimento, las procedentes de microorganismos que accidentalmente alcanzaron el producto o que se añadieron intencionadamente y las adicionadas premeditadamente.

El uso de enzimas en la fabricación de los alimentos tiene una serie de ventajas:

- Presentan una gran especificidad de sustrato y de acción, pudiendo modificar un componente del alimento sin alterar los demás.
- Pueden alcanzar una alta velocidad de reacción en condiciones suaves de temperatura, pH, etc., permitiendo reacciones bien gobernadas, rápidas y continuas (Belitz y Grosch, 1988), sin que se observen efectos secundarios que podrían aparecer en condiciones más extremas.
- Las cantidades necesarias para lograr el efecto deseado son muy pequeñas y, por sí mismas, no alteran las propiedades físico-químicas de los alimentos (García de Fernando, 1987).

I.5.1. Finalidades y fuentes de enzimas.

De acuerdo con Fox (1980), las enzimas que se utilizan en la fabricación de alimentos

pueden clasificarse de la siguiente manera:

1. Enzimas que participan activamente en el proceso; es, probablemente, el uso más antiguo de estos compuestos y por el que se obtienen productos finales muy distintos de la materia prima original. En un principio se utilizaron como un medio de prolongar la vida útil de ciertos alimentos, tales como la leche o los zumos de frutas, y más tarde como una forma de diversificación (Gatfield, 1988). Ejemplos de estos son la fabricación de quesos y bebidas alcohólicas.

2. Enzimas utilizadas para mejorar la calidad de un producto, existiendo o no métodos alternativos; son las utilizadas para conseguir el ablandamiento de la carne o la hidrólisis del almidón y la lactosa. También se emplean para recuperar el aroma y el sabor perdidos en algunos alimentos durante el procesado; este efecto se observó al añadir preparaciones de enzimas durante la reconstitución de verduras deshidratadas (Hewitt y col., 1956). Por último, algunas enzimas de origen fúngico se utilizan para eliminar sabores y aromas no deseados de los alimentos (Bigelis, 1992). Un ejemplo es la adición de sulfhidriloxidasa de *Aspergillus niger* para eliminar sabores extraños en leche U.H.T. (Swaisgood y Horton, 1989).

3. Enzimas usadas como coadyuvantes o mejorantes tecnológicos o económicos: por ejemplo, en la fabricación continua de pan.

4. Enzimas empleadas en la preparación de ingredientes alimentarios, como jarabes de almidón y dextrosa, mezclas para pastelería o en las industrias del café, té y chocolate (Becze, 1970).

Se pueden distinguir cuatro fuentes principales de enzimas en los alimentos (Gatfield, 1988):

- a) Enzimas endógenas del alimento: pueden contribuir al sabor y aroma naturales del alimento, pero muchas de ellas se destruyen durante el procesado de los mismos.
- b) Enzimas procedentes de microorganismos contaminantes: su acción puede ser

fuente de sabores no deseados ("off-flavors").

c) Enzimas producidas por microorganismos deseables y deliberadamente añadidos a los alimentos; realizan muchas funciones en la fabricación de alimentos. También dan lugar a la producción de metabolitos responsables del sabor y aroma (alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas, etc.).

d) Enzimas añadidas intencionadamente a los alimentos con fines diversos, distintos a la generación de sustancias aromáticas y sápidas, como las pectinasas en la clarificación de ciertos zumos o la quimosina para la precipitación de las caseínas.

Algunas aplicaciones concretas de enzimas en la industria alimentaria se recogen en la tabla I.1.

I.5.2. Enzimas proteolíticas en la fabricación de alimentos.

I.5.2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y TIPOS DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS.

Las enzimas proteolíticas se caracterizan por catalizar la hidrólisis de las proteínas rindiendo cadenas polipeptídicas más pequeñas y, finalmente, aminoácidos libres. En los alimentos tienen un papel importante, tanto las que están presentes naturalmente en ellos como las añadidas intencionadamente como tales o a través de microorganismos.

Las enzimas proteolíticas han sido clasificadas según criterios muy variados: basándose en el intervalo de pH al que son activas (ácidas, neutras o alcalinas), en su capacidad para hidrolizar proteínas específicas (colagenasa, elastasa) o en su similitud con enzimas bien caracterizadas (tripsina, quimosina, catepsina, etc.) (Löffler, 1986). El modo de clasificación más adecuado parece ser el basado en el mecanismo de acción (Hartley, 1960), que ha sido el utilizado por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica (Dixon y Webb, 1979). De esta forma se distinguen dos grandes grupos de enzimas proteolíticas: endo y exopeptidasas (Bergmann, 1942).

A) Endopeptidasas o proteinasas: actúan en el interior de la cadena peptídica,

Tabla I.1. Aplicación de enzimas en la producción de alimentos (adaptada de Trevant y col., 1987)

Procesos o Productos	Enzimas					
	Amililasas	Catalasas	Celulasas	Lipasas	Proteasas	Pectinasas
Panadería	Aceleración de la fermentación, mejora del volumen, textura y estructura de la masa.			Modificación de las grasas	Mejora de textura y volumen de la masa	
Pastelería	Recuperación del azúcar a partir de residuos.					Producción de espesantes.
Ind. Láctea		Eliminación de peróxido de hidrógeno en la leche		Producción de queso, producción de helados	Producción de queso, proteínas hidrolizadas de leche	
Ind. Cervecera	Triturado		Extracción		Control del nitrógeno	
Cereales	Alimentos precocinados				Producción de condimentos	
Saborizantes	Clarificación del jarabe de malta		Extracción	Extracción de grasa	Jarabe de malta, sabor salado	Extracción
Vino	Producción de mosto	Control del color	Producción			Clarificación del mosto, producto hidrolizado

rompiendo las proteínas en fragmentos más pequeños.

Existen cuatro tipos de endopeptidasas (Hartley, 1960; Belitz y Grosch, 1988):

1. Serín proteinasas (EC 3.4.21):

Se denominan también proteinasas alcalinas, ya que son activas a valores de pH comprendidos entre 7 y 11. Presentan en su centro activo un resto de serina y otro de histidina.

Gran número de bacterias y hongos producen serín proteinasas, entre ellos *Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *Streptomyces fradiae*, *S. griseus* y *Aspergillus oryzae*. De origen animal son la tripsina, quimotripsina, elastasa y trombina.

La especificidad por el sustrato de cada una de las enzimas pertenecientes a este grupo es, a menudo, bastante diferente, ya que los grupos específicos implicados en la unión con dicho sustrato son distintos. Por ejemplo, la quimotripsina presenta especificidad por sustratos que contengan tirosina, fenilalanina y triptófano, mientras que la elastasa la tiene respecto a los que contienen alanina (Whitaker, 1972).

Su mecanismo de acción es, en cambio, similar en todos los casos; al principio se origina un éster por la reacción del oxígeno del resto de serina del centro activo y la porción acilo del sustrato con la liberación de la porción amino de éste. Se produce, por lo tanto, un compuesto intermedio acil-enzima que posteriormente reacciona con una molécula de agua para liberar la enzima y el producto de la reacción (Dunn, 1989).

Las serín proteinasas son inhibidas por compuestos tales como los organofosfatos, los fluoro sulfonilos, las cumarinas, o por inhibidores proteicos, como el ovomucoide o el inhibidor de la tripsina presente en la soja, los cuales se unen reversiblemente a estas enzimas (Salvesen y Nagase, 1989).

2. Tiol proteinasas (EC 3.4.22):

Son endopeptidasas con cisteína en su centro activo; presentan una zona de actividad muy amplia, comprendida entre pH 4,5 y 10, encontrándose su actividad óptima dentro del intervalo 6,0-7,5. (Belitz y Grosch, 1988). Son bastante estables cuando se las somete a

temperaturas entre 60 y 80°C a pH neutro (Whitaker, 1972).

Su mecanismo de acción presenta similitudes con el de las serín proteinasas, al formarse un compuesto covalente intermedio. Se cree que el anión sulfuro de la cisteína está implicado en un ataque nucleofílico directo sobre el sustrato carbonilo. La rotura del compuesto acil-enzima intermedio se realiza por la unión de una molécula de agua (Dunn, 1989). También presentan cisteína e histidina en su centro activo (Whitaker, 1972).

Los inhibidores de las tiol proteinasas son péptido diazometanos, péptido epóxidos e inhibidores proteicos naturales, como la cistatina (Salvesen y Nagase, 1989). También son inhibidas por iones de metales pesados (Sluyterman, 1967).

Las tiol proteinasas hidrolizan péptidos, amidas, ésteres y especialmente enlaces peptídicos en los que intervienen aminoácidos básicos, leucina o glicina (Becze, 1970).

Como representantes típicos de este grupo se encuentran diversas proteinasas de origen vegetal, como la papaína (procedente de *Carica papaya*), bromelaína (de *Ananas comosus*) y ficina (de *Ficus spp*), y proteinasas procedentes de estreptococos.

La papaína cruda es una mezcla de proteasas de baja especificidad. Puede hidrolizar desde proteínas hasta sustratos de bajo peso molecular, siendo los enlaces peptídicos más susceptibles los formados por grupos carboxilo de la lisina y arginina α -amino sustituidas (Hill, 1965) y el segundo enlace peptídico desde el grupo carboxilo de la fenilalanina (Schechter y Berger, 1968). La papaína purificada es una única enzima, compuesta por una cadena polipeptídica sencilla con 212 restos aminoacídicos y cuyo peso molecular es de 23.900 d. La molécula presenta una profunda hendidura que la separa en dos partes. Sólo tres segmentos de la cadena cruzan esta hendidura, encontrándose a un lado el resto de cisteína 25, esencial en el centro activo. Durante la reacción, el sustrato se sitúa en la hendidura de forma que el enlace susceptible de hidrólisis se coloque en posición adyacente al grupo sulfhidrilo. Existe un segundo grupo implicado en el centro activo de la papaína que está formado por un grupo carboxílico (Asp-158), un resto de histidina o por ambos (Whitaker, 1972).

Recientemente, Baeza y col. (1990) han aislado otro tipo de papaína de *Carica candamarcensis* que presenta una elevada actividad proteolítica y esterasa, entre 5 y 8 veces mayor que la papaína procedente de *Carica papaya*.

3. Metalo proteinasas (EC 3.4.24):

Son proteasas que presentan iones metálicos en el centro activo, principalmente Zn^{2+} . Son activas en el intervalo de pH comprendido entre 6 y 9, y presentan una baja especificidad (Belitz y Grosch, 1988).

Este grupo de enzimas no forma compuestos covalentes intermedios durante su actuación. La proteinasa nativa presenta una molécula de agua en una de las posiciones de coordinación del átomo metálico, la cual se desplaza al coordinarse en su lugar el grupo carbonilo del enlace peptídico atacado. La molécula de agua está unida también a un resto de ácido glutámico por un puente de hidrógeno, cuyo grupo carboxilo sirve para ayudar al ataque de esta molécula de agua sobre el carbonilo peptídico (Dunn, 1989).

La mayoría de los inhibidores específicos de este grupo de enzimas basan su acción en la quelación del átomo de Zn^{2+} (por ejemplo el EDTA). Existen también otros inhibidores, como el TIMP (inhibidor tisular de las metaloproteasas), de naturaleza proteica, o el dodecil sulfato sódico (Salvesen y Nagase, 1989).

A este grupo pertenecen proteasas bacterianas y fúngicas, como las procedentes de *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. thermoproteolyticus* (termolisina), *Streptomyces griseus* (pronasa) y *Aspergillus oryzae*.

La pronasa, procedente de *Streptomyces griseus*, no es realmente una sola enzima sino una mezcla de al menos siete proteinasas, dos o más aminopeptidasas y una carboxipeptidasa (Narahashi y col., 1968). Contiene varias proteinasas neutras estables a pH entre 7,0 y 7,5 en ausencia de Ca^{2+} o entre 5 y 9 en presencia de este elemento. Respecto a su especificidad de sustrato, Morihara y col. (1968) indican que hidrolizan enlaces peptídicos que contengan un grupo amino de leucina, fenilalanina o tirosina. En la pronasa existen también tres proteinasas alcalinas (a, b y c). El tipo b es inestable a valores de pH inferiores a

5, mientras que los otros dos presentan un intervalo de estabilidad más amplio, entre 4,0 y 6,5.

Las amino y carboxipeptidasas son metaloenzimas y se inactivan, al igual que las proteinasas neutras, con EDTA (Narahashi y col., 1968; Narahashi, 1970) y son estables a pH 5-8 en presencia de calcio.

4. Carboxil proteinasas (EC 3.4.23):

Se denominan también proteinasas ácidas, ya que presentan grupos ácidos en su centro activo.

Existen representantes de este tipo de enzimas tanto de origen animal como microbiano. Entre las primeras se encuentran la pepsina y la quimosina, cuyo pH de actividad óptima está comprendido entre 2 y 4, y la catepsina D, que presenta una actividad óptima a un pH entre 3 y 5 (Belitz y Grosch, 1988). A valores de pH superiores pierden rápidamente actividad, al sufrir una desnaturalización (Whitaker, 1972). Las proteinasas procedentes de microorganismos presentan su pH óptimo de actividad en el intervalo de 1 a 5, y están presentes tanto intra como extracelularmente. Las más estudiadas han sido las de origen fúngico y, en menor medida, las bacterianas (*Clostridium spp*, lactobacilos) y las de protozoos (*Tetrahymena pyriformis*) (Sodek y Hofmann, 1970).

Las proteinasas ácidas microbianas se han dividido en enzimas tipo pepsina, entre las que se encuentran las producidas por *Aspergillus oryzae*, *A. awamori*, *A. niger* y *Penicillium spp*; y las de tipo quimosina, con acción coagulante de la leche, como las producidas por *Aspergillus usarii* y *Mucor spp* (Belitz y Grosch, 1988).

Se cree que el mecanismo de acción de estas enzimas no se basa en un ataque nucleofílico de un grupo funcional de la enzima (Hoffmann y col., 1984) y, por lo tanto, no aparece un compuesto intermedio covalente entre la enzima y un fragmento del sustrato. El centro activo de estas enzimas contiene dos restos de ácido aspártico, que establecen enlaces de hidrógeno con el sustrato formando un compuesto tetraédrico intermedio. La rotura de éste da lugar a un producto complejo que contiene dos mitades del sustrato y su disociación

origina un complejo acilo o amino (Dunn, 1989).

Tanto la quimosina como la pepsina parecen presentar una especificidad por el sustrato similar. Esta última muestra una especificidad primaria por el resto aminoacídico que proporciona el grupo -NH del enlace peptídico susceptible. El resto es, preferentemente, de fenilalanina, tirosina o triptófano (Whitaker, 1972).

Estas proteinasas se inhiben con diversos ésteres de diazoacetilaminoácidos, que reaccionan con los grupos carboxílicos del centro activo (Belitz y Grosch, 1988). Las aspartil proteinasas aisladas de mamíferos (pepsina, quimosina, catepsina D) son inhibidas por la pepstatina A, que es un compuesto semejante a un pentapéptido producido por *Streptomyces spp* que contiene dos restos del β -aminoácido estatina (Salvesen y Nagase, 1989).

B) Exopeptidasas: actúan bien desde el extremo carboxilo o bien desde el amino, liberando los aminoácidos terminales uno a uno.

Las exopeptidasas comprenden los siguientes grupos de enzimas (Belitz y Grosch, 1988):

a) α -aminoacetilpéptido-hidrolasas (EC 3.4.11):

Escinden los aminoácidos desde el extremo N-terminal. Comprende diversas aminopeptidasas, como la aminopeptidasa presente en el citosol de las células eucariotas, de gran actividad sobre péptidos con un resto L-leucina en el extremo N-terminal con un grupo α -amino libre; y la tripéptido aminopeptidasa, que hidroliza sólo tripéptidos con un grupo α -amino libre y α -carboxílico libre (Dixon y Webb, 1979).

b) Dipéptido-hidrolasas (EC 3.4.13):

Escinden dipéptidos que presentan tanto el grupo NH_2 terminal como el grupo COOH terminal no substituidos. Algunos ejemplos son la carnosinasa, anserinasa, glicil-glicina dipeptidasa o prolinasa (Dixon y Webb, 1979).

c) Dipeptidilpéptido-hidrolasas (EC 3.4.14):

Liberan dipéptidos desde el extremo N-terminal. Un ejemplo típico es la catepsina C.

d) Peptidilpéptido-hidrolasas (EC 3.4.15):

Escinden dipéptidos del extremo carboxiterminal. En este grupo se encuentra la carboxicatepsina.

e) Serín-carboxipeptidasas (EC 3.4.16):

Separan aminoácidos desde el grupo carboxiterminal y tienen un resto de serina en el centro activo. La especificidad de estas enzimas viene determinada primariamente por el aminoácido que porta el grupo carboxílico libre. La presencia de aminoácidos aromáticos en la tercera posición desde el extremo C-terminal aumenta considerablemente la afinidad de la enzima por el sustrato, aunque no el grado de catálisis (Abranowitz y col., 1967). Representantes de este grupo son la carboxipeptidasa C y la catepsina A.

f) Metalocarboxipeptidasas (EC 3.4.17):

Al igual que las anteriores atacan el extremo C-terminal, pero presentan un átomo metálico en el centro activo (Zn^{+} o Co^{2+}). Pertenecen a este grupo las carboxipeptidasas A y B.

I.5.2.2. PROTEASAS PRESENTES EN LOS EMBUTIDOS DE IMPORTANCIA EN SU MADURACION.

Como ya se mencionó anteriormente (véase I.4.4.2.1), las proteasas presentes en los embutidos proceden de los microorganismos que se encuentran en ellos y de las enzimas nativas de la carne que forma parte de su composición.

No se tienen conocimientos muy amplios acerca de las proteasas que producen las bacterias lácticas de origen cárnico, pero sí se sabe mucho más de las de origen lácteo, las cuales han sido estudiadas más profundamente. Por ello, se puede inferir que las de origen cárnico deben poseer un sistema proteolítico tan complejo como aquéllas, ya que ambas son filogenéticamente similares.

Respecto a los lactococos, se han realizado numerosas investigaciones y se han publicado recientemente varias revisiones al respecto (Smid y col., 1991; Tan y col., 1993). De forma resumida, se sabe que los lactococos producen una proteinasa ligada a la pared celular (Thomas y col., 1974; Exterkate, 1975) cuya síntesis está regulada por la presencia en el medio de aminoácidos y péptidos (Exterkate, 1979). La enzima se libera al medio en ausencia de Ca^{2+} , lo que sugiere que estos iones son necesarios para estabilizar la unión de la enzima a la pared celular (Marshall y Law, 1984) o que el calcio es fundamental para que la enzima permanezca en una configuración activa (Exterkate, 1979). Los lactococos elaboran también una gran variedad de peptidasas, aunque su localización es incierta. No obstante, recientes estudios con anticuerpos monoclonales (Tan y col., 1992) parecen indicar que se encuentran mayoritariamente en el interior de la célula. Entre las peptidasas caracterizadas hay aminopeptidasas (Atlan y col., 1989; Niven, 1991), di- y tripeptidasas (Law, 1979; Bosman y col., 1990), aril-peptidil-amidasas (Marshall y Law, 1984; Exterkate y de Veer, 1987), x-propil-dipeptidil aminopeptidasas (Atlan y col., 1990; Bockelmann y col., 1991) y propil aminopeptidasas (Kaminogowa y col., 1984; Baankreis y Exterkate, 1991).

Las investigaciones que se han realizado con los lactobacilos de origen lácteo son menos numerosas, pero se sabe que elaboran diversas proteinasas ligadas a la pared, como las serín proteinasas aisladas de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (Hegazi y Abo-Elnaga, 1987; Næs y Nissen Meyer, 1992) o la metalo proteinasa y la cisteín proteinasa liberadas de la pared de *Lb. delbruecki* subsp. *bulgaricus* (Ezzat y col., 1987; Laloi y col., 1991). Al igual que sucede con la proteinasa ligada a la pared producida por los lactococos, algunas serín proteinasas de los lactobacilos pueden ser liberadas mediante tampones libres de Ca^{2+} (Zevaco y Gripon, 1988). En cuanto a las peptidasas, los estudios tampoco son muy abundantes, bastante menos que los realizados en los lactococos (Pritchard y Coolbear, 1993). Se han caracterizado diversas metalo-aminopeptidasas (Bockelmann y col., 1992; Miyakawa y col., 1992), la mayoría de ellas localizadas en el citoplasma y algunas en la pared celular; y una x-prolil dipeptidil aminopeptidasa (Bockelmann y col., 1991; El Abboudi

y col., 1992). También se ha purificado una dipeptidasa con propiedades semejantes a la procedente de los lactococos (Wohlrab y Bockelmann, 1992) y se ha aislado una carboxipeptidasa (Abo-Elnaga y Plapp, 1987).

Al igual que en el caso de las bacterias lácticas, las investigaciones sobre la actividad proteolítica de micrococos aislados de quesos son más numerosas que las realizadas sobre los de origen cárnico, y se ha observado que algunas cepas de estos microorganismos presentan dicha actividad. Se han estudiado tanto la actividad proteolítica intra como extracelular de los micrococos procedentes de quesos (Ducastelle y Lenoir, 1969; Nath y Ledford, 1972), comprobándose que todas las proteinasas extracelulares aisladas de distintas cepas presentaban una actividad óptima a valores de pH alcalinos y que la perdían a pH ácido (Robertson y Perry, 1961; Desmazeaud y Hermier, 1968). También se ha observado la existencia de proteinasas intracelulares, endopeptidasas, aminopeptidasas y dipeptidasas en estos microorganismos (Bhowmik y Marth, 1989). Ortíz de Apodaca y col. (1993) señalan que la actividad proteolítica de las micrococáceas es más intensa conforme se incrementa la temperatura (dentro de un intervalo de 22 a 45 °C) y se reduce considerablemente a 10°C. Asimismo, las proteinasas aisladas por estos autores muestran su actividad óptima a pH alcalino, en tanto que la pierden de forma acusada a pH ácido (entre 5,0 y 5,5).

En cuanto a las enzimas proteolíticas nativas de la carne, se pueden distinguir tres tipos:

Calpaínas: Son cisteínproteinasas activadas por Ca^{2+} (Kang y col., 1981; Penny y col., 1985). Existen dos clases de calpaínas: la calpaína I (μCANP), que se activa con concentraciones micromolares de calcio del orden de 50 a 100 μM , y la calpaína II (mCANP), que se activa con concentraciones de 1 a 5 mM (Dayton y col., 1981; Penny y col., 1984; Koohmaraie y col., 1986; Zimmerman y Schlaeffer, 1988). Ambas enzimas se encuentran en el citosol de las miofibrillas y su pH óptimo de actuación es de 7,5. A los pHs típicos de los embutidos crudos curados (aproximadamente 5,5), la calpaína I presenta un 18% de la actividad máxima. La calpaína II es aún más sensible a la acidez (Dransfield, 1993). Por ello,

es probable que su actividad no sea relevante en los embutidos. Durante la fabricación de jamones curados, sólo se detectó dicha actividad en los jamones crudos y tras el salado, no encontrándose posteriormente (Sárraga y col., 1993).

Catepsinas: Se encuentran en los lisosomas de las células musculares. Existen seis tipos: A, B, C, D, H y L (Goll y col., 1983). Las catepsinas A y B₂ son carboxipeptidasas y la C₁ es una dipeptidilpeptidasa, perteneciendo todas ellas al grupo de las exopeptidasas (Bird y Carter, 1980). Dentro de las endopeptidasas existen dos tipos de catepsinas (Barret y McDonald, 1980): las tiolproteinasas (catepsinas B₁, H y L) y las aspartilproteinasas (catepsina D).

Las catepsinas tienen un importante papel en la transformación del músculo en carne. La catepsina D rompe la línea Z y los filamentos cercanos a la banda H, mientras que la catepsina L ocasiona la fragmentación de las miofibrillas y la rotura de las líneas Z y M. Por la acción conjunta de estas dos enzimas, la estructura lateral de las miofibrillas se deteriora de forma acusada (Davídek y col., 1990) y la textura de la carne sufre grandes modificaciones.

Los valores de pH óptimos para las diferentes catepsinas se muestran en la tabla I.2.

Tabla I.2. Valores de pH óptimos de actividad de las catepsinas de la carne.

Catepsina	pH óptimo	
	1)	2)
A	5,5	
B ₁	4,0-6,5	3,0-6,0
B ₂	5,5-6,0	
C ₁	5,0-6,0	
D	3,0-5,0	2,5-4,5
H	5,5-6,5	5,0-7,0
L	3,0-6,5	3,0-6,0

Según: 1) Bird y Carter, 1980; Barret y McDonald, 1980.
2) Etherington, 1984.

Teniendo en cuenta que el pH de los embutidos adquiere valores entre 4,8 y 6,0 a lo largo de la maduración, puede deducirse que estas enzimas podrían desarrollar una importante actividad proteolítica en estos productos. Toldrá y col. (1992) estudiaron la actividad de diversas catepsinas en sistemas modelo bajo las mismas condiciones que se encuentran en los embutidos crudos curados. Las actividades de las catepsinas B y B+L fueron elevadas en medios con concentraciones de sal de 30 g/l, mientras que las de las catepsinas H y D se vieron más afectadas, al igual que las actividades leucín, arginín y tirosínhidrolasa. Los nitratos y el ácido ascórbico no influyeron significativamente en dichas actividades. La baja actividad de agua presente en los embutidos fermentados afectó profundamente a todas las enzimas, así como el pH ácido que se alcanza durante la maduración. Estos autores concluyen que la actividad de las catepsinas B, L y D sería apreciable durante el amasado y en la fermentación, mientras que sólo la catepsina L presentaría una actividad significativa durante la maduración propiamente dicha.

Durante la elaboración de jamones curados se ha observado la presencia de actividad catepsina a lo largo de todo el proceso (Sárraga y col., 1993), aunque según describen Toldrá y col. (1993) dicha actividad varía dependiendo del tipo de catepsina; así, estaba presente en las captesinas B, H y L, aún siendo baja, al final del proceso (15 meses), mientras que la actividad proteolítica de la catepsina D casi desapareció a los 5-10 meses. Estos autores concluyeron que las catepsinas B y L eran particularmente activas, especialmente al principio del secado de los jamones.

Oligopeptidasas: Dentro de ellas se incluyen:

- Carboxipeptidasas: catepsinas A y B₂. Hidrolizan la unión carboxi-terminal.
- Aminopeptidasas: hidrolizan el residuo N-terminal de los péptidos. Son la leucilaminopeptidasa y las arilamidasa ácida, neutra y básica (Bird y Carter, 1980). Se encuentran todas ellas en el citosol y su pH óptimo de actuación oscila entre 6 y 8.

- Dipeptidasas: hidrolizan enlaces peptídicos de dipéptidos con los grupos NH_2 y COOH libres. Se han aislado glicil-glicina dipeptidasa, glicil-leucina dipeptidasa, prolidasa y prolinaasa (Okitani y col., 1981). Su pH óptimo de actuación oscila entre 7,0 y 8,8.
- Dipeptidilpeptidasas: hidrolizan dipéptidos a partir del extremo N-terminal no sustituido. Son las dipeptidil aminopeptidasas II, III y IV. La primera presenta un pH óptimo de 4,5-6,0, y las otras dos son neutras (Bird y Carter, 1980).

I.5.2.3. APLICACION DE PROTEASAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.

Las proteasas son enzimas ampliamente utilizados en la producción de alimentos y, posiblemente, las más importantes desde el punto de vista económico, ya que son imprescindibles en industrias como la quesera o la cervecera (Kilara, 1985b).

Las mezclas de enzimas proteolíticas usadas con mayor frecuencia en tecnología alimentaria contienen endopeptidasas, obtenidas a partir de animales, plantas o microorganismos (Belitz y Grosch, 1988). Los principales usos de las proteasas hasta el momento son los siguientes:

1. Participación en procesos tradicionales de fermentación:

En muchos casos se desconocen qué proteasas intervienen en estas fermentaciones. Son fundamentales en la fabricación de alimentos orientales como miso, tempeh o salsa de pescado (Nakadai y col., 1977; Impoolsup y col., 1982). Se ha demostrado que las proteinasas ácida, alcalina y neutra de *Aspergillus spp* tienen un importante papel en el desarrollo del sabor de ciertos productos fermentados orientales, al liberar péptidos y aminoácidos, especialmente ácido glutámico (Löffler, 1986).

2. Fabricación del pan:

Las proteasas nativas del grano de trigo presentan escasa actividad (Barrett, 1975), por lo que se añaden proteasas exógenas a la masa asociadas con enzimas amilolíticas (Federici, 1981). Las más utilizadas son las proteasas procedentes de *Aspergillus oryzae*, las cuales hidrolizan y acortan las cadenas del gluten, permitiendo la formación de películas proteicas

(Löffler, 1986), con lo que se disminuye el tiempo de amasado, aumenta la retención de gas y mejora el aroma y la textura del producto final (Underkofler, 1976).

3. Elaboración de queso y derivados:

Un paso fundamental en la fabricación del queso es la formación de la cuajada debido a la precipitación de las caseínas merced a la acción de ciertas proteinasas. Tradicionalmente se ha utilizado la renina o quimosina procedente del cuajar de terneros lactantes. Dada la gran demanda de esta enzima y su escasa disponibilidad, se han buscado sustitutos como la pepsina, extraída de estómagos bovinos y porcinos (Fox, 1982), y proteinasas procedentes de microorganismos (*Mucor mihei*, *M. pusillus* y *Endothia parasitica*). Estas últimas se emplean comúnmente en algunos países, como Estados Unidos (Law, 1984b).

Las enzimas proteolíticas tienen una gran importancia en el desarrollo de las características sensoriales del queso. Por ello, se ha considerado que la adición de proteasas podría ser un sistema útil para lograr la aceleración de su maduración. Esto se tratará más ampliamente en el apartado I.6.1.

Otro uso de las proteasas en la industria quesera ha tenido como objetivo la obtención de quesos modificados enzimáticamente para ser usados como agentes saborizantes y aromatizantes en diversos productos, debido al alto precio del queso fabricado por métodos tradicionales. Se suelen emplear enzimas de origen fúngico, procedentes de especies de los géneros *Rhizomucor*, *Penicillium* y *Aspergillus* (Bigelis, 1992).

4. Ablandamiento de la carne:

Diversas proteinasas microbianas y vegetales se utilizan para acelerar el proceso de maduración de la carne y aumentar su blandura. Las más utilizadas son las tiol proteinasas de origen vegetal: papaína, ficina y bromelaína (Dransfield y Etherington, 1981) y, en menor medida, las de *Aspergillus oryzae* y *Bacillus subtilis* (Bernholdt, 1975). Aunque hace algunos años se pensaba que las proteinasas de origen vegetal actuaban preferentemente sobre el tejido conectivo, reduciéndolo a una masa amorfa y liberando moléculas que contenían hidroxiprolina (Wang y col., 1957, citado por Sargeant y col., 1993), actualmente se

considera que actúan también sobre las proteínas miofibrilares. La papaína en particular es más activa sobre ellas que sobre las proteínas del tejido conjuntivo, como el colágeno (Wilson y col., 1992). La papaína es, precisamente, la enzima más comunmente utilizada como ablandador, empleándose en cantidades tales que en la carne se alcance 1 mg/kg aproximadamente, aunque se han utilizado, a veces, hasta niveles de 4 mg/kg (Sargeant y col., 1993).

El mayor problema que presenta la utilización de ablandadores es el de su aplicación homogénea en la carne. Se han probado distintos métodos, como añadirlas sobre la superficie de la carne, sumergir las piezas en una solución enzimática (Lawrie, 1974) o inyectarlas en el torrente circulatorio inmediatamente antes del sacrificio de los animales. En la carne liofilizada se ha empleado la rehidratación con soluciones de enzimas (Belitz y Grosch, 1988). Es probable que el uso de papaína en el tratamiento de la carne, tanto antes como después del sacrificio, se prohíba en la UE durante el año 1994 (Sargeant y col., 1993).

5. Preparación de hidrolizados proteicos.

Los hidrolizados proteicos se obtienen con tres propósitos principales: inducir propiedades funcionales deseables en las proteínas, producir péptidos pequeños y aminoácidos utilizables en alimentos dietéticos (fortificantes) y como agentes saborizantes y aromatizantes (Kilara, 1985b).

En la elaboración de hidrolizados proteicos se emplean una gran variedad de proteasas, tanto de origen animal, vegetal como microbiano. En general no se utiliza un sólo tipo de enzima, ya que no sería capaz de hidrolizar completamente las proteínas, sino preparaciones combinadas para obtener finalmente aminoácidos y pequeños péptidos (Davídek y col., 1990). A pesar de que se han elaborado desde la antigüedad, todavía no es posible explicar detalladamente los procesos hidrolíticos que ocurren, ya que el pescado es un sustrato muy complejo y contiene grandes cantidades de inhibidores de las proteinasas (Gilberg, 1993). Es muy frecuente la preparación de hidrolizados proteicos de pescado para aumentar el aprovechamiento de partes o especies poco consumidas, obteniéndose productos derivados

con buenas características de sabor y propiedades funcionales apropiadas; también se obtienen productos solubles que se utilizan en la elaboración de sopas, bebidas y alimentos infantiles (Hale, 1969).

Los hidrolizados se emplean también para incrementar el valor nutritivo de los alimentos a los que son añadidos. Un ejemplo de ello es la utilización de hidrolizados de pescado mediante Alcalasa en galletas tipo "cracker" (Yu y Tan, 1990).

6. Fabricación de cerveza:

Las enzimas proteolíticas se utilizan en la elaboración de la cerveza para eliminar la turbidez producida por la precipitación de proteínas a bajas temperaturas. Tradicionalmente se han empleado con este fin la papaína, bromelaína y ficina (Löffler, 1986), aunque pueden ser reemplazadas por proteinasas microbianas producidas por *Aspergillus oryzae* y *Bacillus subtilis* (Bass y Cayle, 1975).

I.5.2.4. INCONVENIENTES DE LA UTILIZACION DE PROTEASAS EN LOS ALIMENTOS.

Como resultado de la hidrólisis proteica mediante enzimas pueden aparecer sabores y aromas anómalos, sobre todo amargos cuando actúan sobre ciertos sustratos, como la caseína, aunque Petritschek y col. (1972) afirmaron que la aparición del sabor amargo depende más de la proteína que de la enzima proteolítica que la ataque. Uno de los problemas observados a este respecto es la aparición de sabores amargos en los quesos. Los péptidos productores del sabor amargo presentan, en general, grupos hidrofóbicos hacia el extremo carboxiterminal de la cadena (Matoba y Hata, 1972). Por otra parte, Ney (1972), Clegg y col. (1974) y Schalinatus y Behnke (1975) observaron que cuanto más elevado era el contenido de aminoácidos hidrófobos, mayor era la tendencia de la proteína a formar péptidos amargos cuando se sometía a hidrólisis. Los aminoácidos presentes con mayor frecuencia en dichos péptidos son leucina, fenilalanina, prolina y ácido piroglutámico, mientras que la metionina y la cisteína siempre están ausentes (Davídek y col., 1990).

I.6. MADURACION ACELERADA DE QUESOS Y EMBUTIDOS.

La mayor parte de las experiencias se han efectuado en quesos. Por ello, en este apartado se describirán con mayor amplitud los aspectos más relevantes de los intentos llevados a cabo para acelerar el proceso madurativo de estos productos. Fue, precisamente, en los conocimientos que se poseían en queso en los que la autora de la presente memoria se basó para realizar la tesis doctoral.

I.6.1. Maduración acelerada de quesos.

Al igual que ocurre con los embutidos crudos curados, los quesos necesitan un proceso largo de maduración para que adquieran las características sensoriales típicas. Esta maduración implica una serie de cambios microbiológicos y bioquímicos, en el transcurso de los cuales las proteínas de la leche se hidrolizan dando lugar a péptidos pequeños y aminoácidos, y los glicéridos a ácidos grasos libres (El Soda y Pandian, 1991).

Al ser un proceso lento, se han intentado acelerar las reacciones bioquímicas que dan lugar a los componentes del sabor y aroma, así como las que afectan a la textura, de forma que la maduración se acorte. Esto conllevaría grandes beneficios desde el punto de vista económico, debido al ahorro en instalaciones y trabajo y la recuperación más temprana del dinero invertido en el producto. Contribuiría también al incremento de la producción de queso en países en desarrollo, en los que las inversiones en instalaciones para su almacenamiento constituyen un factor limitante (El Soda, 1986). La consecuencia de todo ello sería la obtención de un producto final con un precio de venta más bajo que incrementaría su competitividad.

La Federación Internacional de Lechería (FIL) ha clasificado los métodos de aceleración de la maduración del queso en 4 clases (Fernández, 1986):

1. Maduración a temperaturas elevadas.

Es el método más sencillo de aceleración de la maduración, ya que sólo exige una ligera adaptación técnica y, además, no existen trabas legales a su aplicación. Sin embargo, tiene el grave inconveniente de que el pH, la humedad y la calidad microbiológica deben ser casi ideales porque, en caso contrario, se puede favorecer el crecimiento de bacterias no deseables y originar sabores y aromas anómalos que dan lugar al rechazo del producto por el consumidor (Law, 1984a). Su uso, por tanto, queda restringido a industrias lácteas con un elevado nivel higiénico (El Soda y Pandian, 1991).

2. Adición de enzimas.

La adición de enzimas es, en principio, un buen método de aceleración de la maduración, ya que presenta una acción específica sobre los sustratos que proporcionarán las sustancias determinantes de las características sensoriales finales del queso, además de ser una técnica relativamente barata. Sin embargo, presenta otra serie de desventajas, ya que existen impedimentos legales para su utilización y su acción es difícil de controlar, pudiéndose producir una sobremaduración.

Aunque no como método de aceleración de la maduración, se han utilizado enzimas (lipasas) tradicionalmente en la fabricación de quesos italianos tipo Grana y Parmesano (Fernández, 1986). Su finalidad es la potenciación del sabor y aroma de los mismos.

A) *Proteasas.*

Ya se ha descrito anteriormente la relevancia que alcanzan los fenómenos proteolíticos en los procesos madurativos. Por ello, sin duda, una de las enzimas utilizadas para acortar la maduración de los quesos han sido las proteasas. Los estudios más numerosos se han llevado a cabo en quesos Cheddar y egipcios, utilizando tanto proteasas producidas por microorganismos relacionados con el queso como procedentes de fuentes ajenas a este producto.

Los resultados obtenidos en los estudios en que se han utilizado proteasas de otros orígenes han sido muy variables. Una de las enzimas más empleadas ha sido la proteinasa

ácida de *Aspergillus oryzae* (Sood y Kosikowsky, 1979; Law y Wigmore, 1982). Esta enzima, incluso a dosis bajas, dió lugar a sabores amargos sin un incremento significativo del sabor. En general, las proteinasas ácidas tienen el inconveniente de permanecer mucho tiempo activas, dando lugar a una proteólisis excesiva.

Fedrick y col. (1986) estudiaron el efecto de la proteinasa neutra de *A. oryzae* en el desarrollo de la proteólisis, sabor, aroma y textura del queso Cheddar durante 6 meses. Observaron que la proteólisis se incrementaba dependiendo de las cantidades de enzima añadidas, al igual que sucedía con la edad estimada de los quesos y su nivel de amargor. Con el transcurso del tiempo y a elevadas concentraciones de proteinasa, los quesos se hacían más blandos, frágiles y presentaban menor elasticidad y cohesión. En cambio, la proteinasa neutra de *Bacillus subtilis*, a concentraciones idóneas, produce un incremento del sabor y aroma sin que aparezcan defectos (Sood y Kosikowski, 1979; Law y Wigmore, 1982, 1983). Su acción puede potenciarse con la temperatura. Kataoka y col. (1987) añadieron distintas concentraciones de proteinasas de *B. subtilis*, *Aspergillus melleus*, *Streptomyces spp* y *A. oryzae* a queso Gouda. Observaron que diversas fracciones nitrogenadas presentaban a los dos meses unos valores similares a los obtenidos en quesos control de 4 meses de maduración, llegando a la conclusión de que el contenido en nitrógeno amínico dependía más del tipo de proteinasa que de la cantidad añadida. Más recientemente, Núñez y col. (1991) estudiaron el efecto de dos preparaciones comerciales de una proteinasa neutra procedente de *B. subtilis* en queso manchego, obteniendo buenos resultados en ambos casos, pero sobre todo con la preparación "Neutrase L", con la que consiguieron la misma intensidad de sabor en 35 días a 16°C que en un queso control madurado durante 90 días a 12°C. En ningún caso aparecieron sabores amargos.

Otras proteasas microbianas empleadas han sido una proteasa de *Penicillium spp.* (Kalinowski y col., 1982; Gripon y col., 1982), que ha dado buenos resultados en quesos duros; la pronasa E de *Streptomyces griseus* (Law y Wigmore, 1982), posiblemente útil a bajas concentraciones; proteasas de *Kluyveromyces lactis* y *Saccharomyces cerevisiae*

(Grieve, 1982); proteínasa de *Pseudomonas fluorescens* (Haard y Patel, 1987); etc.

En general, no se han empleado en los quesos proteasas purificadas procedentes de bacterias lácticas, sino extractos libres de células. Con ello se ha intentado evitar la aparición de sabores amargos y modificaciones en la textura, defectos que sí se han detectado al usar proteasas purificadas (Fernández, 1986). Se han estudiado tanto los efectos de extractos de una sola especie como de un combinado de varias, obteniendo buenos resultados con proteínasa de *Penicillium candidum* junto con extracto de *Streptococcus lactis* (Kalinowski y col., 1982), con *Lactobacillus plantarum* (El Soda y col., 1986), con la combinación de extractos libres de células de *Kluyveromyces fragilis*, *Micrococcus spp* y *Lactobacillus casei* (Hassan y Abozeid, 1988), o sólo con extracto de *L. casei* (El Abboudi y col., 1990).

Otra forma de evitar las alteraciones de la textura y el sabor al utilizar proteinasas en la maduración acelerada de queso sería añadir exopeptidasas junto con endopeptidasas. De esta forma, las exopeptidasas liberarían aminoácidos libres, y la formación de péptidos de sabor amargo sería menos manifiesta (Law, 1985).

B) Lipasas.

La adición de lipasas ha obtenido buenos resultados en quesos denominados comúnmente "fuertes", en los que se apreciaron unos incrementos de sabor y aroma notables. En diversos quesos italianos, a los que ya tradicionalmente se añadían lipasas durante su elaboración, se ha conseguido aumentar o modificar su sabor mediante la adición de lipasas comerciales (Botazzi, 1965; Moskowitz, 1980).

Los resultados obtenidos han sido diferentes según el tipo de queso utilizado. No obstante, se produce de forma general un aumento de los ácidos grasos libres y, dentro de ellos, especialmente de la fracción volátil. En el queso egipcio Domiati, Ashour y col. (1986) observaron la misma intensidad de aroma y sabor en quesos de 4 semanas de maduración fabricado con lipasas comerciales, que en los controles de 8 semanas; sin embargo, a concentraciones de enzima muy altas aparecieron sabores rancios a las 8 semanas de maduración. También se han obtenido buenos resultados en quesos azules (Jolly y

Kosikowsky, 1975; Revah y Lebeault, 1989) y en queso Cheddar americano (Kosikowsky e Iwasaki, 1975; Sood y Kosikowsky, 1979). Sin embargo, el uso de lipasas en el queso Cheddar inglés ha sido un fracaso (Law y Wigmore, 1985), ya que los ácidos grasos de cadena larga liberados dieron lugar a sabores jabonosos, y los ácidos grasos de cadena corta, o no incrementaron el aroma, u originaron sabores defectuosos a las distintas concentraciones de enzima empleadas.

C) β -Galactosidasa.

La β -galactosidasa hidroliza la lactosa rindiendo glucosa y galactosa. Diversos autores (Anónimo, 1977; Weaver y Krager, 1978; Gooda y col., 1983) atribuyen el incremento de la proteólisis en los quesos tratados con esta enzima al mejor crecimiento de los microorganismos debido al aumento de la glucosa disponible, con la siguiente potenciación del sabor y aroma. Sin embargo, se ha detectado la presencia de proteasas contaminantes en una preparación comercial de esta enzima (Olano y col., 1983) y se han caracterizado diversas enzimas proteolíticas (Grieve y col., 1983), por lo que los efectos beneficiosos pudieron deberse a dichas impurezas. Por ello, todavía no se tiene la certeza de si la β -galactosidasa puede o no influir en la potenciación del sabor y aroma del queso.

La incorporación de las enzimas al queso presenta una serie de dificultades debidas a las características de su fabricación. Para obtener una distribución totalmente homogénea sería necesario añadirlas a la leche antes formar la cuajada. Pero, en estas condiciones, una gran parte de la enzima se pierde con el suero y, además, impide el uso de este para fines posteriores. La adición de proteasas a la leche presenta también el inconveniente de que las enzimas pueden actuar sobre las proteínas lácteas antes incluso de formar la cuajada. Se han sugerido distintos métodos de incorporación de enzimas, tales como su adición en polvo a la cuajada (Law y Wigmore, 1982) o en forma de inyección, pero presentan grandes desventajas y actualmente se investiga la utilización de enzimas encapsuladas en liposomas o en cápsulas de grasa láctea (El-Soda y col., 1989).

3. Adición a la cuajada de pastas semilíquidas.

Las pastas son cuajadas preparadas asépticamente a las que se les añade NaCl y se incuban a 30°C durante 7 días en recipientes cerrados; posteriormente se añaden a la leche o a la propia cuajada. Este método fue desarrollado por Kristoffersen y col. (1967) y es el que, hasta ahora, ha dado los mejores resultados en el incremento del aroma y sabor. El mecanismo de aceleración de la maduración no se conoce todavía, pero se ha atribuido a la elevada tasa de microorganismos presentes en las pastas (Bockleman y Lodin, 1974). El principal inconveniente de este método es la dificultad de controlar la flora microbiana de la pasta.

Industrialmente, las pastas semilíquidas se utilizan para producir quesos modificados enzimáticamente que se emplean en la formulación de quesos, aperitivos y sucedáneos de productos lácteos (El Soda, 1986).

4. Utilización de cultivos iniciadores modificados.

La modificación de los cultivos iniciadores consiste básicamente en un cambio en la capacidad de las bacterias de fermentar la lactosa, conservando o potenciando sus capacidades lipolítica y proteolítica. De esta forma, un aumento en la población microbiana implicaría el incremento de dichas actividades sin que se aumentara la producción de ácido láctico.

Existen tres tipos de tratamientos de los iniciadores:

a) Físicos: consisten en producir un "shock" térmico en las bacterias lácticas, tanto mediante la aplicación de calor como de frío. Se han obtenido mejores resultados con el uso de altas temperaturas (Pettersen y Sjöström, 1975; Bartels y col., 1985),

b) Químicos: los iniciadores se someten a la acción de compuestos como n-butanol o lisozima (Law y col., 1976).

c) Genéticos: una de las modificaciones realizadas es la obtención de mutantes con actividad fermentadora de la lactosa muy disminuida o lac^- (Law, 1984a). Otros genes que posiblemente en el futuro den buenos resultados son aquellos que codifican proteínas superficiales (aumento de la lisis proteica), aminopeptidasas (rotura de péptidos y

desaparición del amargor) y aquellos que producen autólisis bacteriana (liberación de enzimas intracelulares al medio) (El Soda y Pandian, 1991).

I.6.2. Maduración acelerada de embutidos crudos madurados.

En el caso de los embutidos, hasta el momento se han hecho escasísimos intentos de acortar el período madurativo de los mismos. Existen, en cambio, múltiples intentos de controlar todos aquellos factores tecnológicos que influyen en el embutido durante su fabricación para obtener productos intachables desde el punto de vista de la normalización del producto final, como calidad de la carne, grado de picado, humedad relativa, temperatura y ahumado (Weisenfels, 1992).

Respecto a la reducción del período madurativo, la bibliografía hallada es poca y el único sistema empleado ha sido la adición de diversas enzimas. Gossling (1990) empleó un complejo enzimático extraído de *Lactobacillus plantarum* en embutidos con 0,3% de glucosa y los comparó con otros fabricados con un cultivo iniciador tradicional (*Pediococcus* y *Micrococcus* spp) con un 1% de lactosa y maltodextrina. Las dosis empleadas del complejo enzimático oscilaron entre 0 y 0,4 g/kg carne, obteniéndose una maduración ligeramente más corta en estos lotes. Sin embargo, los lotes con cantidades más elevadas del complejo presentaron un color y aroma menos satisfactorios. Finalmente, Gossling (1990) concluyó que esta mezcla enzimática, usada a concentraciones comprendidas entre 0,15 y 0,25 g/kg con 0,3-0,5% de glucosa, da lugar a un acortamiento de la maduración sin pérdida de calidad y con mejora del aroma y color.

Por otra parte, Næs y col. (1991) han probado el efecto de la adición de lipasas y proteinasas procedentes de cuatro especies de bacterias lácticas, una de ellas *Lactobacillus casei* NCDO151, en las propiedades sensoriales del salami. En los lotes que contenían lipasa se detectaron diferencias significativas, con olores anómalos, color más claro y más amargor y viscosidad con respecto al control. Estas diferencias no se apreciaron en los lotes con

proteínasa. Cuando se compararon los embutidos que contenían la más alta y la más baja concentración de proteínasa, estos últimos resultaron más blandos. Los autores lo atribuyen a una mayor pérdida de agua del lote con elevada concentración, debido a la reducción de la capacidad de retención de agua ocasionada por la proteólisis. Más recientemente Næs y col. (1992) han continuado este estudio, utilizando en esta ocasión la misma proteínasa y la lipasa procedente de *Lactobacillus plantarum* MF32. La única diferencia apreciada en los lotes que contenían esta última fue un incremento en la concentración de ácidos grasos, especialmente los insaturados.

El lote con proteínasa sí que mostró diferencias respecto al control, especialmente al principio de la maduración. A lo largo de los 10 primeros días se observó una clara diferencia entre ambos lotes, tanto en la mayor palidez del producto como en una caída más acusada del pH (de 4,95 en el control a 4,5 en el lote con proteínasa), aunque al final del período madurativo (42 días) desapareció esta diferencia. Sin embargo, este hecho no se reflejó en los resultados obtenidos en el nitrógeno no proteico. Los autores atribuyen esta mayor caída del pH a un incremento en la concentración de oligopéptidos ácidos. Por otra parte, el comportamiento de los compuestos nitrogenados solubles en agua del control después de 42 días de maduración fue similar al obtenido a los 2-3 días en el lote con proteínasa.

I.7. OBJETIVOS PERSEGUIDOS EN EL PRESENTE TRABAJO.

La maduración de un embutido es un proceso gradual y de larga duración. El tiempo de maduración depende del embutido de que se trate aunque, en cualquier caso, no suele ser inferior a tres semanas, pudiendo en algunos tipos ser superior incluso a 4 ó 6 meses. Obviamente, la reducción del tiempo de maduración sería siempre una circunstancia deseable; supondría un mejor uso de los locales y equipos requeridos para la fabricación de embutidos y, en definitiva, una mayor competitividad en el mercado.

Según se ha descrito anteriormente (véase I.6.1), se han realizado numerosos intentos

para acortar el período de maduración de los quesos mediante diversos procedimientos (Law, 1984a). Entre ellos, la adición de enzimas ha sido el más estudiado; se han utilizado para ello lipasas, proteasas y β -galactosidasa. No obstante, el éxito ha sido sólo parcial, debido fundamentalmente a la solubilidad en agua de dichas enzimas, lo que les permite escapar con el suero en el momento de formar la cuajada. Por ello, la retención de la enzima suele ser escasa y su rendimiento bajo.

Cuando se planteó la presente tesis doctoral, en 1989, no se había realizado investigación alguna sobre la posibilidad de acortar el período madurativo de los embutidos mediante la adición de enzimas. No obstante, en el curso del desarrollo de la parte experimental aparecieron tres publicaciones (Gossling, 1990; Næs y col., 1991; Næs y col., 1992) sobre el tema. Las enzimas utilizadas y los resultados más relevantes han quedado recogidos en el apartado anterior.

Por otra parte, la autora de la presente memoria no tiene conocimiento de que hasta el momento se hayan ensayado enzimas procedentes de microorganismos no relacionados con los típicos de estos productos (bacterianos o fúngicos) o de origen vegetal.

La inexistencia de trabajos al respecto y el hecho de que la proteólisis tiene una gran influencia en las características sensoriales del producto final, llevó a la autora a establecer la hipótesis de que, en el caso de los embutidos, la adición de proteasas podría ocasionar una aceleración del proceso madurativo o, por lo menos, un aumento del contenido en compuestos sápidos y aromáticos procedentes de la hidrólisis proteica, que podría mejorar las características organolépticas del producto terminado.

Al contrario que en los quesos, en los embutidos no existe la posibilidad de pérdidas de enzimas, dado que en la fabricación de estos productos la totalidad de los ingredientes añadidos en la fase de formulación se embuten conjuntamente y van a participar, de una u otra forma, en las reacciones químicas y bioquímicas que acaecen durante la maduración.

El objetivo final del presente trabajo era, pues, conocer si la adición de proteasas constituía un método útil potenciar el sabor y aroma de los embutidos y/o acortar el período de

maduración de los mismos.

Para el desarrollo del proyecto, era necesario seleccionar las enzimas que se iban a utilizar. Como se expuso en el apartado I.5.1, las endopeptidasas se clasifican en cuatro grupos: proteinasas de serina, tiol proteinasas, proteinasas ácidas y metaloproteiniasas. Se eligió una enzima representante de cada grupo, excepto las serín proteinasas, ya que las enzimas de este grupo presentan su actividad óptima a pH alcalino, muy alejado del de estos productos (en torno a 5,0). De entre todas las proteinasas pertenecientes a los tres grupos restantes se eligieron las que a continuación se relacionan [para su elección se tuvo presente la experiencia derivada de las investigaciones realizadas en los quesos (véase I.6.1), excepto la papaína, que se eligió por su uso en el ablandamiento de carnes]:

- Metaloproteiniasas: pronasa E de *Streptomyces griseus*. Se ha observado que su adición a quesos conduce a un incremento en el sabor y aroma junto con muy escaso amargor en comparación con otras proteasas (Law y Wigmore, 1982). Aunque no se ha empleado nunca en la fabricación de embutidos, sí se ha utilizado el microorganismo que la produce, *S. griseus*, como cultivo iniciador, (Eilberg y Liepe, 1977).

- Proteiniasas ácidas: aspartil proteiniasa de *Aspergillus oryzae*. Esta enzima ha sido utilizada también para intentar acortar la maduración de los quesos (Law, 1984a).

- Tiol proteiniasas: papaína procedente de *Carica papaya*. Se ha utilizado frecuentemente como ablandador de carnes y también en la eliminación de la turbidez en la industria cervecera.

El objetivo global era, como se ha dicho anteriormente, intentar acortar el período madurativo de los embutidos o, alternativamente, potenciar el sabor y aroma del producto final, lo que incluía otros objetivos parciales:

1. Conocer el grado de degradación proteica que ocasionaban las enzimas elegidas.
2. Comprobar el efecto de las proteasas en los factores que determinan la calidad organoléptica de los embutidos (textura y sabor, fundamentalmente).

3. Determinación, al menos de forma aproximada, de la concentración más adecuada de enzima para conseguir los efectos deseados.

La autora de esta Tesis, al proyectar su realización, era consciente de que, desde un punto de vista aplicativo, los resultados podrían tener un valor limitado, ya que era el primer intento de esta naturaleza que se realizaba y, por tanto, cabía la posibilidad, por una parte, de que las enzimas no fueran autorizadas para su uso industrial y, por otra, que los resultados no fueran todo lo satisfactorios que se esperaba, o también que la elección de las enzimas no hubiera sido la adecuada. No obstante, se acometió el desarrollo del proyecto con la seguridad, al menos, de que los resultados serían el punto de partida para la realización de estudios posteriores por la misma autora o por otros investigadores.

II.- M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

II.1. MATERIAL.

El agua destilada utilizada para realizar las extracciones y para preparar disoluciones acuosas se obtuvo por destilación en un aparato "Pobel" modelo 706.

Las pesadas de precisión se realizaron en una balanza analítica "Sartorius" mod. 2443 y las ordinarias en balanzas electrónicas "AND" mod. FX 320 y mod. EK 1200A.

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

La homogeneización de las muestras para análisis químicos se realizó en un homogeneizador "Polytron" mod. 15/30 PT dotado de un vástago mod. PTA 20 TS. Cuando se homogeneizaron muestras para análisis microbiológicos se empleó un triturador "Colworth" mod. Stomacher 400 y bolsas estériles "Sterilin".

La esterilización de los medios de cultivo se llevó a cabo en un autoclave "Selecta" mod S-477 a 121°C durante 20 minutos.

Las placas para los recuentos microbianos se incubaron en estufas "Heraeus" mod. B-6200.

Las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga refrigerada "Sorvall" mod. RC-5B, equipada con un rotor mod. GSA.

El hielo triturado necesario para el baño empleado en el enfriamiento de los disolventes para HPLC y para la homogeneización de las muestras se obtuvo en una máquina "Scotsman" mod. AF-10.

La conservación de las muestras en congelación (-24°C) se realizó en arcones "Liebherr" y las mantenidas bajo refrigeración en frigoríficos "Fagor" y "Philco".

Las pipetas y micropipetas automáticas utilizadas fueron "Brand" mod. D6980 y "High Tech" mod. V-2000, V-200 y V-20, que dispensan volúmenes de 5ml, 200-1000µl, 20-200µl y 2-20µl, respectivamente.

El material de vidrio empleado en las experiencias fue de tipo "Pyrex".

II.2. PRODUCTOS.

II.2.1. Reactivos.

Todos los productos químicos utilizados en las experiencias que se describen en esta memoria fueron calidad reactivo, suministrados por las siguientes firmas: "Merck", "Sigma" y "Panreac".

Los medios de cultivo utilizados en las experiencias microbiológicas procedían de la firma "Oxoid" y los componentes minerales fueron suministrados por "Panreac".

II.2.2. Disolventes y purificación de los mismos.

Los disolventes utilizados en las extracciones y análisis de muestras por HPLC fueron éter etílico ("Probus", "Panreac"), cloroformo ("Panreac"), butanol ("Merck"), hexano ("Merck"), acetonitrilo ("Carlo Erba"), tetrahidrofurano ("Baker") y metanol ("Carlo Erba"). Aquellos utilizados como disolventes en la cromatografía líquida (acetonitrilo, tetrahidrofurano y metanol) eran de calidad HPLC.

El cloroformo se purificó en el laboratorio por destilación fraccionada con una columna de rectificación de Vigreux, eliminando las fracciones de "cabeza" y "cola".

El éter etílico se liberó de peróxidos antes de su uso, destilándolo sobre polvo de hierro reducido.

II.3. METODOLOGIA.

II.3.1. Determinación de la actividad de las proteasas.

Las enzimas empleadas en las experiencias que se describen en el presente trabajo fueron las siguientes:

- Proteasa purificada tipo XIV de *Streptomyces griseus* (Pronasa E).
- Proteinasa cruda tipo II de *Aspergillus oryzae* (Aspartil proteinasa ácida).
- Papaína cruda tipo II de *Carica papaya*, purificada del látex de papaya.

Todas ellas fueron suministradas por la firma "Sigma".

La determinación de la actividad de las enzimas comerciales empleadas se realizó a partir de una solución inicial de dichas enzimas con una concentración de 0,2 mg/ml en tampón TRIS-HCl, pH 6,5, con la que se realizaron diluciones decimales.

El sustrato empleado fue una solución de azocaseína (Sigma) al 0,8% en tampón TRIS-HCl 0,2 M, pH 6,5. La reacción se realizó mezclando un volumen (1 ml) de cada dilución de las tres enzimas y otro del sustrato. Seguidamente se incubaron a 37°C durante 10, 20, 30, 60, 90 y 120 minutos. Asimismo, se preparó un blanco al que se le añadió tampón en lugar de la enzima. Transcurrido el tiempo correspondiente, la reacción se detuvo añadiendo a cada tubo 1 ml de una disolución de ácido tricloroacético al 6%. A continuación, la mezcla se filtró a través de papel Whatman nº 42. Finalmente se midió la absorbancia del filtrado a 440 nm.

Se definió como unidad de actividad enzimática a la cantidad de enzima que produce un aumento de 1 unidad de absorbancia a 440 nm en 1 hora a 37°C utilizando como sustrato azocaseína (0,8 %) en tampón TRIS-HCl 0,2M, pH 6,5.

II.3.1.1. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA PRONASA E EN DIFERENTES CONDICIONES.

Para la prueba de actividad con distintos valores de pH se prepararon varias soluciones de concentración 4 µg/ml de pronasa E en tampón TRIS-HCl a pH 5,0, 5,5, 5,8 y 6,0, todos ellos cercanos a los alcanzados por los embutidos con pronasa E. El sustrato empleado fue una solución de azocaseína (Sigma) al 0,8% en tampón TRI-HCl 0,2M con los mismos valores de pH que los de las soluciones de proteinasa. La reacción se realizó mezclando 1 volumen (1ml) de cada solución de pronasa E con otro de la solución de sustrato con el pH correspondiente. Seguidamente se incubaron a 25°C durante 60 minutos, preparando además un blanco al que se le añadió tampón en lugar de la enzima. Transcurrido el tiempo, la reacción se detuvo añadiendo a cada tubo 1 ml de una disolución de ácido tricloroacético al 6%. Después la mezcla se filtró a través de papel Whatman nº 42 y se midió la absorbancia del filtrado a 440 nm.

La prueba de la actividad de la pronasa E a distintas temperaturas se efectuó de igual forma pero utilizando soluciones de enzima y sustrato a pH 5,0 y 7,0, e incubándolas a 5, 10, 15 y 25°C durante 60 minutos.

II.3.2. Preparación de las muestras.

II.3.2.1. FABRICACION DE LOS EMBUTIDOS.

La fabricación de los embutidos se realizó en una planta piloto localizada en una industria local. Se partió en todos los casos de una porción de la masa preparada por dicha industria y empleada en la elaboración de productos comerciales. Para ello, se separó de la cadena de producción la cantidad necesaria de dicha pasta. Su composición (% p/p) es la que a continuación se ofrece:

Carne magra de cerdo	56
Carne magra de vaca	12
Tocino	25
Dextrosa	0,8
Lactosa	1,0
Dextrina	1,8
Sal	2,5
Glutamato sódico y/o potásico	0,25
Nitrato sódico y/o potásico	0,0085
Nitrito sódico y/o potásico	0,0065
Pimienta negra molida	0,14
Ascorbato	0,046

Tanto la carne de cerdo y vacuno como el tocino procedían de producto previamente congelado. Posteriormente se picaron por separado a temperatura de refrigeración, hasta obtener un tamaño de partícula de 5 mm aproximadamente. A continuación se añadió el resto de ingredientes a la carne picada y todo ello se mezcló después con el tocino en una amasadora. La pasta así obtenida permaneció 48 horas en refrigeración. Previamente a su embutición, se añadieron las cantidades programadas de cada una de las proteasas objeto de estudio. Después se amasó en una mezcladora para conseguir un reparto homogéneo.

Se realizaron 4 experiencias:

* Experiencia 1:

Se añadieron a los embutidos dos concentraciones de pronasa E de *Streptomyces griseus* : 600 unidades enzimáticas/kg salchichón (la unidad ha quedado definida en II.3.1) y 6000 unidades/kg salchichón. Al lote control no se le añadió enzima.

* Experiencia 2:

Se prepararon embutidos con dos dosis distintas de aspartil proteinasa de *Aspergillus oryzae*. Se elaboraron tres lotes: el control, otro con 800 unidades enzimáticas/kg salchichón y el tercero con 4500 unidades/kg salchichón.

* Experiencia 3:

Se añadieron a los embutidos dos concentraciones diferentes de papaína, procedente de *Carica papaya*: 800 unidades/kg salchichón y 4500 unidades/kg salchichón. Igualmente se preparó un lote control sin enzima.

***Experiencia 4:**

Se añadió a la masa antes de embutir la concentración de cada una de las proteinasas anteriores que, de acuerdo con los resultados, se consideró más adecuada. Estas fueron 300 unidades/kg salchichón de pronasa E, 100 unidades/kg salchichón de aspartil proteinasa y 500 unidades/kg salchichón de papaína. El lote control no contenía enzima.

Previamente a su adición a la masa, las proteinasas se disolvieron en 100-200 ml de agua destilada a fin de conseguir un reparto más homogéneo, a excepción de la papaína, que se disolvió en un volumen igual de tampón fosfato 0,1M y pH 6,6. A todos los lotes controles se les añadió un volumen igual de agua destilada para que su contenido inicial de humedad fuera lo más parecido posible.

Seguidamente, la masa de cada uno de los lotes se embutió en tripa artificial de colágeno, obteniéndose piezas de 40 mm de diámetro y 15 cm de longitud, con un peso aproximado de 200g, obteniéndose un peso total por lote de alrededor de 5 kg. Inmediatamente se transportaron a una cámara climática "Kowell" mod. CC31 equipada con un registrador "Sekonic" mod. SD-H50 a temperatura, humedad y velocidad de aire controladas, en la cual se realizó el proceso de maduración.

II.3.2.2. CONDICIONES DE MADURACION DE LOS EMBUTIDOS.

Las fases de fermentación y maduración se llevaron a cabo en la cámara antes mencionada, bajo condiciones de temperatura, humedad y velocidad de aire controladas. Inicialmente, la temperatura se mantuvo a 22°C durante 24 horas y la humedad relativa al 90% durante 12 horas. Transcurrido este período, la temperatura y la humedad relativa se redujeron gradualmente hasta alcanzar, al cuarto día de maduración, 12°C y 75%, respectivamente. Estos valores se mantuvieron constantes hasta el final del proceso. La velocidad de aire se mantuvo a 1m/s durante todo el período de maduración.

II.3.3. Toma de muestras.

Las muestras necesarias para las determinaciones fisicoquímicas y microbiológicas se obtuvieron periódicamente durante la maduración, y consistieron en un salchichón de cada lote (alrededor de 200g).

Para cada determinación se recogieron muestras de distintos puntos de los salchichones (centro, zona superficial y extremos de cada pieza) a fin de que fueran lo más representativas posible. Después de tomar la porción correspondiente para los análisis microbiológicos se conservaron, al igual que los extractos obtenidos a partir de ellas, a temperatura de congelación (-24°C) para su posterior análisis.

II.3.4. Determinaciones físicas y fisicoquímicas.

II.3.4.1. DETERMINACION DEL EXTRACTO SECO.

Se pesaron con exactitud aproximadamente 3g de muestra en cápsulas de porcelana, introduciéndolas en una estufa "Heraeus" mod. T-6200 a 110°C hasta peso constante. Las determinaciones se efectuaron por triplicado.

II.3.4.2. DETERMINACION DE CENIZAS.

Se determinaron por triplicado, a partir de muestras (pesadas con exactitud) de 3g aproximadamente en un horno mufla "Heraeus" mod. MR 170 a 500°C durante 24 horas. Posteriormente se pesaron las cenizas residuales.

II.3.4.3. DETERMINACION DEL PH.

Se efectuaron diversas medidas por muestra introduciendo el electrodo en distintos puntos del embutido.

II.3.4.4. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE AGUA.

Se llevó a cabo en un higrómetro de punto de rocío "Decagon" mod. CX-1 (Decagon Devices Inc. Pullman, Washington. U.S.A.), a 24°C. Antes de la medida de la a_w , las muestras, introducidas en las cápsulas suministradas con el aparato, se dejaron reposar en una cámara a 24°C durante 15-20 minutos para que alcanzaran dicha temperatura.

II.3.5. Seguimiento de la proteolisis: determinación de distintas fracciones nitrogenadas.

II.3.5.1. DETERMINACION DEL NITROGENO TOTAL.

El contenido de nitrógeno total de las muestras se determinó mediante el método de Kjeldahl. Los tubos de digestión con aproximadamente 1,5g de muestra, 20 ml de ácido sulfúrico concentrado, unas perlas de vidrio y un catalizador compuesto de sulfato potásico y sulfato de cobre (Kjeltabs CK, Thompson & Capper Ltd., England) se calentaron en un digestor "Büchi" mod. 425 durante el tiempo necesario para que la digestión fuera completa (1,5-2 horas). Una vez digerida la muestra se diluyó con agua destilada y se llevó a una unidad de destilación "Büchi" mod. 315. El amoníaco destilado se recogió en una solución de ácido bórico al 4%. Se utilizó como indicador una disolución al 0,2% de rojo de metilo y 0,1% de azul de metileno en alcohol etílico (96% v/v). Este indicador vira de violeta a verde a pH 5,4. A continuación se valoró con una solución de ácido clorhídrico 0,5 N.

El porcentaje de nitrógeno se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ nitrógeno} = V \times N \times 14,007 \times 100 / \text{mg muestra}$$

donde

V = volumen (ml) de HCl empleado en la valoración

N = normalidad de la disolución de HCl.

Los resultados finales se expresaron en términos de porcentaje de extracto seco.

II.3.5.2. PREPARACION DE LAS MUESTRAS UTILIZADAS EN LA DETERMINACION DEL NITROGENO SOLUBLE EN AGUA, NO PROTEICO, SOLUBLE EN ACIDO FOSFOTUNGSTICO AL 5%, SOLUBLE EN ACIDO SULFOSALICILICO AL 5% Y BASICO VOLATIL TOTAL.

Las muestras de salchichón, de 40g de peso las del primer día de maduración (masa sin embutir) y de 30g las de los días siguientes, se homogeneizaron en agua destilada hasta conseguir un volumen final de 350 ml durante el tiempo necesario para obtener una consistencia semilíquida. Seguidamente, se centrifugaron a 6500 x g a 4°C durante 6 minutos. El líquido sobrenadante se filtró a través de papel Whatman nº 4. El sedimento se sometió a una reextracción con 100 ml de agua en las mismas condiciones. Este segundo sobrenadante se filtró y se unió al primero, registrando el volumen final. Después se conservó en congelación para su posterior análisis.

II.3.5.3. DETERMINACION DEL NITROGENO SOLUBLE EN AGUA (NSA).

Una parte alícuota (25ml) del extracto obtenido según se ha detallado en II.3.5.2. se evaporó a sequedad en una estufa a 110°C de temperatura. Sobre la muestra desecada se determinó el porcentaje de nitrógeno por el método Kjeldahl, como se describe en II.3.5.1. Las determinaciones se efectuaron siempre por triplicado y el resultado final se expresó en gramos de nitrógeno por 100 g de extracto seco.

II.3.5.4. DETERMINACION DEL NITROGENO NO PROTEICO (NNP).

A 50 ml del extracto obtenido según se ha descrito en II.3.5.2, se añadió un volumen igual de una solución de ácido tricloroacético al 25%. Se dejó en reposo 30 minutos a 4°C y después se filtró a través de papel Whatman nº 2. El filtrado se sometió a desecación a 110°C durante 12-15 horas. Posteriormente, se determinó el contenido en nitrógeno por el método

Kjeldahl, según se ha descrito en II.3.5.1. El resultado final se expresó en gramos de nitrógeno por 100g de extracto seco.

II.3.5.5. DETERMINACION DEL NITROGENO SOLUBLE EN ACIDO FOSFOTUNGSTICO AL 5% (NSF).

A partir del filtrado obtenido según se ha apuntado en II.3.5.2, se tomó una parte alícuota de 50 ml a la que se añadió otro volumen igual de una solución de ácido fosfotúngstico al 10% para precipitar las proteínas y los péptidos de peso molecular superior a 600 D. Se dejó reposar la mezcla durante 30 minutos a 4°C y después se filtró a través de papel Whatman nº 2. El filtrado obtenido se evaporó a 110°C durante 12-15 horas. El nitrógeno se determinó por el método Kjeldahl, como se ha descrito en II.3.5.1. Los resultados se expresaron en gramos de nitrógeno por 100g de extracto seco.

II.3.5.6. DETERMINACION DEL NITROGENO SOLUBLE EN ACIDO SULFOSALICILICO AL 5% (NSS).

La cuantificación del nitrógeno soluble en ácido sulfosalicílico al 5% se realizó utilizando el reactivo de ninhidrina, que se preparó mezclando partes iguales de ninhidrina al 4% en etilén glicol monometiléter y de cloruro estannoso al 0,16% en tampón citrato 0,2M a pH 5.

Las muestras empleadas fueron partes alícuotas del extracto obtenido según se ha descrito en II.3.5.2. A un volumen de dicho sobrenadante se añadió otro volumen igual de una solución de ácido sulfosalicílico al 10% para precipitar las proteínas, péptidos e incluso diaminoácidos, permaneciendo solubles los aminoácidos libres (Reiter y col., 1969). La mezcla se dejó reposar 17 horas a 0-1°C. Posteriormente se filtró a través de papel Whatman nº 2 y su pH se ajustó a 5 con NaOH. Después se realizaron diluciones de las muestras en matraces aforados de 25 y 50 ml de capacidad, dependiendo de la concentración de nitrógeno soluble en ácido sulfosalicílico al 5% esperada. A 1 volumen de cada muestra así preparada

se añadieron 3 volúmenes del reactivo de ninhidrina. Después de agitados, los tubos se introdujeron en un baño de agua hirviendo durante 30 minutos. A continuación se enfriaron al chorro de agua y se añadieron 8 ml de alcohol n-propílico al 50%. Se agitaron los tubos enérgicamente, se dejaron reposar 10 minutos a temperatura ambiente y se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro "Kontron" mod. Uvikon 820 o "Hitachi" mod U-2000 a 570 nm. La lectura obtenida se interpoló en una curva patrón (figura II.1), hecha con diferentes concentraciones de glicina y confeccionada cada vez que se preparó el reactivo, calculándose después la cantidad de NSS en mg Gly/100g de extracto seco. Para facilitar la comparación con otras fracciones nitrogenadas, los resultados finales se expresaron en mgN/100g de extracto seco. El peso molecular de la glicina es de 75,1, del que 14,007 corresponde al único átomo de nitrógeno que posee dicho aminoácido. Por tanto, el 18,65% de la molécula corresponde al nitrógeno. El cálculo se realizó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{NSS (mgN/100g E.S.)} = C \times P / 100$$

donde,

C : cantidad de NSS expresada en mg de glicina en 100g de extracto seco.

P : porcentaje de la molécula de glicina correspondiente al nitrógeno.

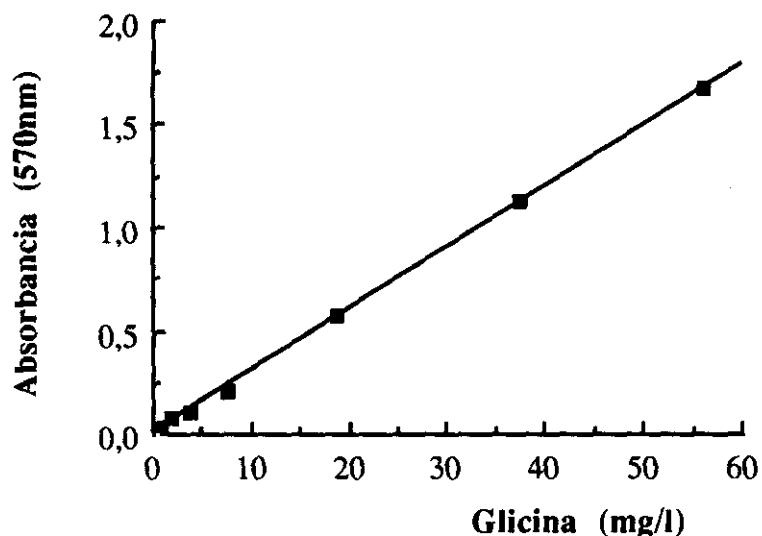


Figura II.1. Gráfica patrón para la determinación del nitrógeno soluble en ácido sulfosalicílico al 5% mediante el reactivo de ninhidrina.

II.3.5.7. DETERMINACION DEL NITROGENO BASICO VOLATIL TOTAL (NBVT).

La determinación se realizó según la técnica descrita por Pearson (1973).

Para preparar el reactivo del ácido bórico de Conway se mezcló un volumen (100 ml) de una disolución al 5% de ácido bórico en alcohol etílico del 95% con 3,5 volúmenes de agua destilada. Cuando el ácido se hubo disuelto, se añadieron 5 ml de un indicador compuesto por una solución alcohólica (p/v) de rojo de metilo al 0,066% y verde de bromocresol al 0,033%. Después se añadió NaOH hasta obtener un color rojizo tenue y alcohol etílico (96%, v/v) hasta alcanzar 5 volúmenes.

Para determinar el nitrógeno básico volátil total se colocaron 2 ml del reactivo de ácido bórico en el compartimento central de una unidad de microdifusión de Conway y se depositó 1 ml del sobrenadante obtenido según se ha descrito en II.3.3.2 en el compartimento exterior. Después, el lado esmerilado de la tapa de la unidad se cubrió con grasa para esmerilados y se colocó sobre la placa dejando una pequeña abertura en el compartimento exterior. A través de este hueco se añadió 1 ml de una solución saturada de K_2CO_3 y se deslizó la tapa hasta conseguir un cierre hermético. La unidad se dejó reposar una noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se tituló el nitrógeno básico volátil fijado por el reactivo del ácido bórico con una solución de ácido sulfúrico 0,0143N.

El cálculo de la cantidad de nitrógeno básico se realizó teniendo en cuenta que 1 ml de 0,0143N de ácido sulfúrico gastado en la titulación equivale a 0,2 mg de nitrógeno.

El resultado se expresó como mg de nitrógeno en 100g de extracto seco. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

II.3.5.8. DETERMINACION DE AMINOACIDOS LIBRES.

II.3.5.8.1. Preparación de las muestras.

En todas las experiencias se partió de 10g de salchichón. La muestra, junto con 50 ml de agua destilada y 0,5 ml de una disolución en HCl 0,2N de norleucina de concentración 10mg/ml (estándar interno), se trituró en un homogeneizador "Polytron" hasta que adquirió una consistencia semilíquida. Se midió el volumen alcanzado y se centrifugó a 6500 x g durante 6 minutos a 4°C. El líquido sobrenadante se filtró a través de papel Whatman nº 2.

Una parte alícuota (10 ml) del sobrenadante se precipitó con 10 ml de una solución de ácido sulfosalicílico al 10% y se dejó en reposo durante 17 horas a 4°C. De esta manera se consiguió la precipitación de la mayoría de los compuestos nitrogenados, permaneciendo los aminoácidos libres en disolución. El sobrenadante se filtró a través de papel Whatman nº 2 y se tomaron 10 ml. Después se ajustó el pH a 7 con NaOH, teniendo siempre en cuenta el volumen añadido para la realización de los cálculos.

II.3.5.8.2. Preparación de la solución patrón de aminoácidos.

Las soluciones patrón se prepararon a partir de productos "Sigma".

Se utilizaron aquellos aminoácidos que están presentes naturalmente en la carne, es decir, las formas L de ácido aspártico, ácido glutámico, hidroxiprolina, asparagina, serina, glicina, glutamina, histidina, treonina, alanina, prolina, arginina, cisteína, tirosina, valina, metionina, isoleucina, leucina, fenilalanina, triptófano y lisina, más el aminoácido utilizado como estándar interno (norleucina). La solución patrón se preparó disolviendo la cantidad adecuada de cada uno de ellos en una solución de HCl 0,2 N para obtener una concentración final de 1 mg/ml.

La solución patrón de L-norleucina (estándar interno) se preparó de igual forma, pero la concentración final fue de 10 mg/ml.

II.3.5.8.3. Derivación de los aminoácidos.

La obtención de los derivados de los aminoácidos se realizó siguiendo el método descrito por Yang y Sepúlveda (1985) con algunas modificaciones.

La solución de marcado se preparó, inmediatamente antes de su uso, con alcohol etílico absoluto, trietilamina y fenilisotiocianato en proporción 7:2:1. La derivación de los aminoácidos se realizó de la siguiente forma: se mezclaron 200 µl de la solución de marcado con 20µl de la muestra preparada como se ha descrito en II.3.5.8.1. De igual forma se derivó la disolución patrón todos los días en que se realizó la cromatografía.

La mezcla se agitó y se dejó reposar durante 10 minutos y después se evaporó hasta sequedad en corriente de nitrógeno en un baño de agua a 52°C durante 20-30 minutos (Beaver y col., 1987). Más tarde se procedió a la resuspensión de los derivados en 500µl de tampón fosfato 0,5 M, pH 7,4 con 5% de acetonitrilo para el patrón y en 200 µl para las muestras.

Antes de su inyección en el cromatógrafo, tanto las muestras como los patrones, se filtraron a través de filtros "Millipore" de 0,45µm de tamaño de poro y se conservaron en refrigeración hasta su uso. Finalmente, se inyectaron 20 µl en el cromatógrafo.

II.3.5.8.4. Cromatografía de los aminoácidos.

Los aminoácidos se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en un cromatógrafo "Beckman" mod. 3390 provisto de un programador mod. 420, dos bombas mod. 110 y un detector de luz ultravioleta mod. 160. El cromatógrafo estaba conectado a un registrador-integrador "Hewlett-Packard" mod. 3394. Se emplearon columnas metálicas rellenas de Pellicular ODS-2 sobre Spherisorb suministradas por la firma "Symta" y columnas rellenas de Supelcosil LC-18, de "Supelco". Ambos tipos de columna tenían un tamaño de partícula de 5µm y unas dimensiones de 4,6x250 mm. La columna se termostató incluyéndola en un dispositivo de vidrio diseñado por la autora a tal fin. El dispositivo contenía en ambos extremos sendos conductos para la circulación de agua impulsada por un baño termostado.

II.3.5.8.5. Disoluciones empleadas en el análisis de los aminoácidos libres.

Disolvente A: Acetato sódico 0,03 M, pH 6,8, con 0,05% de trietilamina (v/v).

Disolvente B: Acetonitrilo y agua (90/10) (v/v).

El agua destilada necesaria para preparar las disoluciones se obtuvo en un sistema de purificación de agua "Milli-Q" de Millipore.

Los reactivos utilizados fueron calidad HPLC y se desgasificaron antes de su utilización por ultrasonificación en un aparato "Branson" mod. 42, efectuando vacío mediante una bomba "Eyela" mod. A-36.

Las disoluciones de sustancias inorgánicas se filtraron a través de filtros "Millipore" HA y 0,45 μ m de diámetro de poro y las orgánicas a través de filtros "Millipore" FH y 0,50 μ m.

II.3.5.8.6. Condiciones cromatográficas.

La fase móvil estaba formada por una mezcla del disolvente A y el disolvente B (su composición puede verse en II.3.5.8.5).

La elución comenzó con un flujo de la fase móvil de 1ml/min y el gradiente de elución se inició con un porcentaje de la solución B del 4%, alcanzando a los 32 minutos el 38,5%. Después se fue incrementando hasta el 99% y 1,5ml/min de flujo en 5 minutos, manteniéndose estas condiciones durante otros 15 minutos. Desde los 52 a los 57 minutos el flujo se redujo a 1ml/min y el porcentaje de la solución B descendió a un 4%. Estas condiciones permanecieron constantes hasta los 67 minutos, restableciéndose así las condiciones iniciales de la cromatografía. La separación se efectuó a una temperatura constante de 35°C,

La detección se realizó con un detector ultravioleta a una longitud de onda de 254 nm.

II.3.5.8.7. Identificación y cuantificación de los aminoácidos.

La identificación de los aminoácidos se realizó basándose en los tiempos de retención

de los aminoácidos analizados. Estos tiempos se compararon con los obtenidos con los aminoácidos patrones cromatografiados en iguales condiciones.

La cuantificación se realizó basándose en que la concentración de cada uno de los aminoácidos separados y detectados a partir de la muestra es proporcional al área comprendida dentro del pico correspondiente obtenido en el cromatograma.

Se calculó un factor de respuesta para cada aminoácido en los patrones empleados en la calibración de la siguiente forma:

$$FR = A_{pi} / A_{pa}$$

donde,

FR = factor de respuesta para el aminoácido correspondiente.

A_{pi} = área correspondiente al estándar interno (L-norleucina) en el cromatograma de la disolución patrón.

A_{pa} = área correspondiente al aminoácido en el cromatograma de la disolución patrón.

La concentración de cada aminoácido en la muestra analizada se determinó aplicando la siguiente expresión:

$$\text{Aminoácido } (\mu\text{g/g}) = Fr \times A_{ma} \times C_{pi} \times 1000 / A_{mpi} \times M$$

donde,

Fr = Factor de respuesta para cada aminoácido

A_{ma} = Área de cada aminoácido en la muestra

C_{pi} = Concentración del estándar interno en la muestra (μg)

A_{mpi} = Área del estándar interno en la muestra

M = μg de muestra de embutido en el volumen inyectado

Los resultados se expresaron finalmente en mg de aminoácido por 100 gramos de extracto seco.

II.3.5.9. DETERMINACION DE AMINAS.

II.3.5.9.1. Extracción de las aminas.

La extracción de las aminas se realizó según la técnica descrita por Spinelli y col. (1974).

En todas las experiencias se partió de muestras de 10g de embutido. La desproteinización se realizó homogeneizando la muestra con 40 ml de ácido perclórico 0,6 N. Al mismo tiempo se añadió 1 ml de 1,6 hexanodiamina como estándar interno. Una vez conseguida una consistencia semilíquida, el homogeneizado se centrifugó a 6500 x g durante 6 min. a 4°C. El líquido sobrenadante se filtró a través de papel Whatman nº 54 y el sedimento se volvió a extraer con agua destilada. Finalmente, el agua procedente de la segunda extracción se mezcló con el filtrado obtenido del líquido sobrenadante y se adicionó KOH 6 N a la mezcla resultante hasta obtener un pH de 6,0.

Las sales inorgánicas de perclorato se precipitaron después por enfriamiento en un baño de hielo picado durante 20 minutos. A continuación se filtró el líquido sobrenadante, el precipitado se lavó con agua destilada y se mantuvo durante 15 min. en un baño de hielo picado. El líquido de lavado del precipitado se filtró y el filtrado resultante se mezcló con el líquido sobrenadante obtenido anteriormente. La mezcla obtenida se saturó con NaCl a temperatura ambiente y su pH se ajustó a 13 con NaOH 10 N; a continuación, se le adicionaron 60 ml de una mezcla de cloroformo/n-butanol (1/1) (v/v) (Farm y Green, 1965). La mezcla final se agitó vigorosamente en un embudo de decantación, retirándose la fase orgánica. Posteriormente, los restos de la mezcla saturada con NaCl se lavaron con 60 ml adicionales de la mezcla de cloroformo/n-butanol (1/1) (v/v) y el extracto obtenido se mezcló con la fase acuosa resultante, procedente de la decantación anterior. La mezcla se agitó vigorosamente en un embudo de decantación, despreciándose la fase acuosa.

Las fases orgánicas obtenidas en las dos decantaciones se mezclaron y depositaron en un matraz que contenía 15 ml de HCl 0,2 N. A continuación, la mezcla se vertió en un embudo

de decantación y se le añadieron 100 ml de hexano. Tras agitar vigorosamente, la fase acuosa (inferior) se pasó a un matraz de rotavapor y la fase orgánica se lavó con 15 ml más de HCl 0,2 N. Tras agitar la mezcla, la fase acuosa se depositó en el matraz que contenía la primera fracción acuosa y se procedió a su evaporación a sequedad en un rotavapor "Büchi" mod. EL, acoplado a un baño termostatado y conectado a un sistema de vacío proporcionado por una bomba similar a la utilizada en la desgasificación (ver apartado II.3.5.8.5).

El concentrado resultante se disolvió en 5 ml de una disolución saturada de NaHCO_3 . Tras agitar la disolución, se procedió a la derivación del extracto amínico.

II.3.5.9.2. Preparación de los derivados dansilo.

Del matraz que contenía los extractos de aminas se pipetearon 250 μl y se vertieron sobre 5 ml de una solución de cloruro de dansilo en acetona (5 mg/ml, p/v). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante toda la noche.

Los patrones se derivaron añadiendo 25 μl de la disolución que contenía las aminas a 5 ml de cloruro de dansilo en acetona (5 mg/ml, p/v).

II.3.5.9.3. Extracción de las aminas dansiladas.

Una vez obtenidos los derivados dansilo, se disolvieron en 15 ml de agua y se extrajeron dos veces con otro volumen igual de éter dietílico. La fase etérea se evaporó a sequedad mediante corriente de nitrógeno en un baño termostatado a 50°C. El extracto se disolvió en 5ml de acetonitrilo y se inyectaron 20 μl de esta solución en el cromatógrafo.

II.3.5.9.4. Cromatografía de las aminas.

Las aminas se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en el aparato Beckman y en las columnas cromatográficas especificados en el apartado II.3.5.8.4.

II.3.5.9.5. Disoluciones empleadas en el análisis de las aminas.

Disolvente A: Acetato sódico 0,01 M, pH 4,2 y tetrahidrofurano (95/5) (v/v).

Disolvente B: Acetonitrilo y tetrahidrofurano (90/10) (v/v).

Los productos utilizados fueron calidad HPLC y se desgasificaron por ultrasonificación a vacío (ver II.3.5.8.5). Las disoluciones de sustancias inorgánicas se filtraron a través de filtros "Millipore" HA y de 0,45 μm de diámetro de poro y las orgánicas en filtros "Millipore" FH y de 0,5 μm .

II.3.5.9.6. Condiciones cromatográficas.

Se obtuvo una buena resolución cromatográfica eluyendo las muestras con una fase móvil formada por una mezcla de las disoluciones A y B cuya composición se cita en II.3.5.9.5. La elución se realizó a flujo constante de la fase móvil (1,5 ml/min) con un gradiente de elución que comenzó con un porcentaje de la solución B del 50%, aumentó gradualmente hasta alcanzar el 90% a los 25 minutos y se mantuvo así hasta el minuto 27. Desde los 27 a los 32 minutos, el porcentaje de la disolución B bajó a un 50%, permaneciendo así hasta los 38 minutos para reestablecer las condiciones iniciales de la cromatografía.

La separación se efectuó a una temperatura constante de 35°C, que se consiguió introduciendo la columna en una camisa de vidrio construida con tal fin y conectada a un baño termostataado.

La detección se realizó con un detector ultravioleta a una longitud de onda de 254 nm.

II.3.5.9.7. Preparación de las disoluciones patrón y del estándar interno.

Las soluciones patrón se prepararon a partir de productos "Sigma".

Se utilizaron las siguientes aminas patrones: triptamina, putrescina, cadaverina, tiramina, espermina, espermidina, feniletilamina e histamina, y, como estándar interno, 1,6 hexanodiamina.

Tanto las disoluciones patrón como la del estándar interno se prepararon disolviendo

la cantidad adecuada de cada amina en una disolución de HCl 0,1 N para obtener una concentración final de 10 mg/ml.

II.3.5.9.8. Identificación de las aminas.

La identificación de las aminas se llevó a cabo basándose en los tiempos de retención de las aminas analizadas. Estos tiempos se compararon con los de las aminas patrones cromatografiadas en las mismas condiciones.

II.3.5.9.9. Cuantificación de las aminas identificadas.

La determinación cuantitativa se basa en el principio de que los pesos de cada uno de los componentes separados en la mezcla son proporcionales a las áreas comprendidas dentro de los picos correspondientes del registro gráfico.

Los factores de corrección de la mezcla de calibración de las aminas utilizadas se determinaron calculando el área del pico de cada amina y aplicando posteriormente la expresión:

$$F_x = X \cdot A_c / C \cdot A_x$$

donde,

F_x = Factor de corrección para la amina correspondiente.

X = Concentración de la amina patrón correspondiente.

A_c = Área medida para el estándar interno (1,6 hexanodiamina).

A_x = Área medida en el registrador para el correspondiente patrón.

C = Concentración del estándar interno (1,6 hexanodiamina).

La tasa de cada amina de las muestras se determinó de acuerdo con la expresión:

$$\text{Aminas } (\mu\text{g/g}) = F_x \cdot A_x \cdot C / A_c \cdot M$$

donde,

F_x = Factor de corrección para cada amina, obtenido como se ha descrito en el párrafo anterior.

A_x = Area medida en el registro para la amina correspondiente.

C = Concentración del estándar interno (μg).

A_c = Area medida en el registro para el estándar interno.

M = Peso de la muestra de embutido (g).

Los resultados se expresaron finalmente en mg de aminoácido por 100 gramos de extracto seco.

II.3.6. Métodos microbiológicos.

II.3.6.1. PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

Se obtuvieron asépticamente 10 g de embutido y se trituraron en un homogeneizador "Stomacher" con 90 ml de agua de peptona al 1% estéril .

II.3.6.2. PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.

Se efectuó de acuerdo con las instrucciones de la casa suministradora ("Oxoid"). En el caso del agar MRS se ajustó el pH a 5,6 con ácido acético glacial. Todos los medios se sometieron a un tratamiento térmico de 20 minutos a 121°C en autoclave.

II.3.6.3. MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS.

Los medios de cultivo empleados en los recuentos fueron:

a) Agar para recuento en placa (PCA) con 1% de NaCl. Se empleó como medio para recuento de microorganismos viables totales.

b) Agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS). Se utilizó para el recuento y aislamiento de bacterias lácticas (Man y col., 1960), ajustando el pH a 5,6 y haciendo las siembras en doble capa.

c) Agar manitol sal (MSA). En él se realizó el recuento de las micrococáceas presentes en el embutido.

II.3.6.4. PREPARACION DE LAS DILUCIONES.

Las diluciones se prepararon a partir de la muestra homogeneizada como se describe en II.3.6.1, tomando de ella 1 ml que se depositó en un tubo que contenía 9 ml de agua de peptona estéril al 1% con 0,85% de NaCl. Después de agitado el tubo, se tomó 1 ml que se añadió a un nuevo tubo con 9 ml de agua de peptona estéril y así sucesivamente, hasta conseguir la dilución deseada.

II.3.6.5. SIEMBRA EN PLACAS.

De acuerdo con el número de microorganismos viables esperado, se tomó 1 ml de las diluciones deseadas y se depositó en placas de Petri. A continuación se vertió una cantidad suficiente de ágar a unos 45°C para cubrir el fondo de la placa; después, éstas se agitaron suavemente para homogeneizar la muestra y el ágar. En los recuentos de bacterias lácticas en ágar MRS, una vez solidificado el ágar, se añadió otra capa de medio para crear condiciones microaerófilas. En todos los casos se sembraron 2 placas de cada dilución.

La incubación de microorganismos viables totales y de micrococáceas se efectuó en una estufa a 32°C durante 48 horas, y la de bacterias lácticas a la misma temperatura durante 72 horas.

Tras la incubación se realizó el recuento de las colonias presentes en las placas, considerando válidos los valores comprendidos entre 30 y 300 colonias. Los resultados finales se expresaron en log u.f.c./gramo de muestra.

II.3.7. Análisis sensorial.

II.3.7.1. PANEL DE CATADORES.

El jurado se componía, como mínimo, de 18 catadores, a quienes previamente se explicó con detalle las características de las pruebas a realizar.

II.3.7.2. PRUEBAS SENSORIALES.

II.3.7.2.1. Prueba triangular.

Esta prueba de diferenciación se realizó de acuerdo con la norma TC 34/SC 12 de la I.S.O. (International Standards Organization).

A cada catador se le presentaron tres muestras y se le informó que dos de ellas eran iguales y debían identificar la distinta. La probabilidad de elegir al azar la muestra distinta es de 1/3.

Las respuestas se interpretaron según las tablas especificadas por la norma I.S.O.

II.3.7.2.2. Prueba preferencial.

Se presentaron al mismo grupo de catadores una muestra distinta de cada lote de embutidos fabricado. El jurado debía calificar el color, apariencia, textura y sabor, con arreglo a una escala hedónica de 1 (muy malo) a 10 (muy bueno). Después se calculó la media de las puntuaciones para cada una de las características examinadas y se determinó el valor de la calidad global de cada lote con arreglo a la siguiente ecuación:

$$\text{Calidad global} = P_{ca} \times 0,1 + P_t \times 0,25 + P_f \times 0,65$$

donde,

P_{ca} = puntuación media del color y apariencia.

P_t = puntuación media de la textura.

P_f = puntuación media del sabor.

III.- RESULTADOS Y DISCUSION

III.1. EMBUTIDOS DE LOS LOTES CONTROL.

El presente trabajo se planeó con el objetivo global de estudiar el efecto de la adición de proteinasas exógenas en la maduración de los embutidos con el fin de conocer si son útiles para acortar el proceso madurativo o, alternativamente, potenciar el sabor y aroma del producto final. Para ello, se realizaron una serie de experiencias consistentes en la elaboración de embutidos experimentales a los que se añadieron diversas enzimas proteolíticas en diferentes dosis. Evidentemente, en cada experiencia se elaboró un lote de embutidos sin adicionar proteínasa, que sirvió como control en cada caso.

La autora opina que, en investigaciones de esta naturaleza, es necesario también comprobar que la evolución de los parámetros seleccionados para su análisis, derivados de los fenómenos que acaecen durante el proceso madurativo se ajusta a lo que ocurre normalmente en un embutido convencional. En definitiva, este primer capítulo se ha preparado con el fin de analizar el comportamiento de los embutidos controles. Además, los resultados obtenidos con estos lotes se discuten conjuntamente para evitar así repeticiones innecesarias en los capítulos correspondientes a cada una de las proteinasas usadas en el trabajo.

III.1.1. Evolución de los parámetros fisicoquímicos.

III.1.1.1. EXTRACTO SECO.

La evolución del extracto seco de los embutidos controles se recoge en la figura III.1. Las gráficas que se obtuvieron fueron similares en todos los lotes. Los valores iniciales fueron siempre en torno al 40% y la pérdida de humedad se produjo de forma constante y gradual a lo largo de la maduración llegándose a cifras finales muy parecidas, aunque el control 1 alcanzó un valor ligeramente mayor. No obstante, en la figura puede observarse que los resultados intermedios que más se desviaron (alrededor de un 10%) fueron los del control

3 respecto a los otros tres lotes. Obviamente, la pérdida de humedad depende estrechamente de la humedad relativa de la cámara de maduración pero, como el programa de dicha cámara fue en todos los casos semejante, las diferencias intermedias observadas entre los lotes pueden atribuirse a la heterogeneidad de la muestra y, de forma particular, a la materia grasa que, muchas veces, no está distribuida homogéneamente, lo que origina fluctuaciones en la composición de la materia grasa que repercuten en el extracto seco.

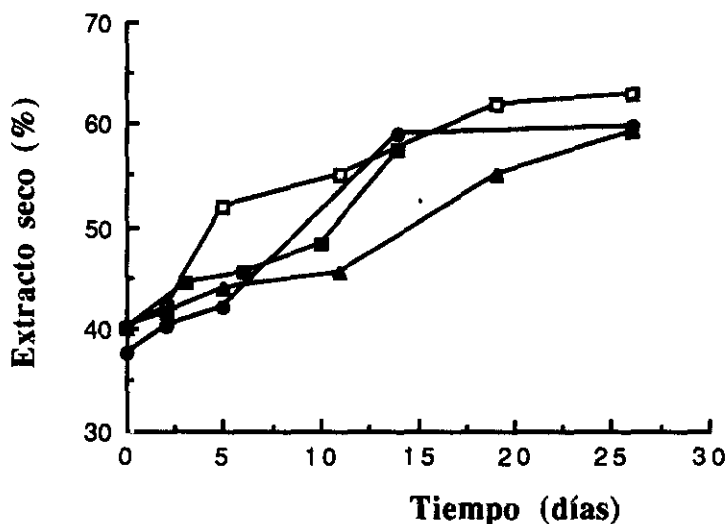


Figura III.1. Evolución del extracto seco en los embutidos controles durante la maduración.
Control 1 (□); control 2 (■); control 3 (▲); control 4 (●).

En el lote 2 el período de maduración duró sólo 14 días, mientras que en los otros se prolongó hasta 26. La razón de acortar el período madurativo de dicho lote fue el excesivo ablandamiento observado en el mismo, debido a la actividad de la aspartil proteinasa (véase III.3.4). Este defecto aconsejó no seguir con la experiencia. Si el proceso hubiera sido más largo, los resultados finales de extracto seco se habrían acercado, con toda seguridad, a los obtenidos para los otros lotes.

Teniendo en cuenta sólo los resultados finales de los extractos secos, independientemente del tiempo de maduración al que fueron sometidos, se puede decir que

los valores registrados en el control de los lotes 1 y 4 fueron similares a los citados por Wardlaw y col (1973) en embutidos americanos, por Baumgartner y col. (1980) en productos madurados a 15°C y por Santamaría y col. (1992b) en chorizo de Pamplona comercial. En los demás lotes, los resultados obtenidos se ajustan más a los reseñados por Mendoza y col. (1983) en el chorizo a los 34 días de maduración y por Incze (1987) en salami húngaro. Ferrer y Arboix (1986b) describieron resultados similares en el salchichón de Vich, pero después de varios meses de maduración. Es posible que la menor pérdida de agua en embutidos de largos períodos de maduración esté relacionado, además de con la humedad del entorno, con la ausencia de carbohidratos, como el caso del salchichón de Vich, lo que ocasiona un menor descenso del pH y, por lo tanto, menor desnaturalización proteica (Gökalp, 1986) y una pérdida menor de agua, dado que se está más lejos del punto isoeléctrico de las proteínas cárnicas. Asimismo, se han descrito valores de extracto seco superiores a los hallados en este trabajo, como los ofrecidos por Barranco y col. (1985) y Domínguez y col. (1988) para chorizo.

A pesar de estas diferencias, puede decirse que los resultados obtenidos en este trabajo caen de lleno en el amplio intervalo de valores descritos para el extracto seco de diferentes embutidos fermentados. Es difícil que las tasas de extracto seco coincidan plenamente; ya se ha comentado anteriormente la dependencia de este parámetro de la humedad relativa del entorno y de la heterogeneidad de la muestra.

III.1.1.2. ACTIVIDAD DE AGUA (a_w).

La representación gráfica de la evolución de la actividad de agua de los embutidos controles se recoge en la figura III.2.

Los valores iniciales fueron prácticamente iguales en todos los casos (0,96-0,97). Todos los embutidos mostraron una evolución lineal descendente y los resultados finales fueron muy semejantes (0,86-0,87). El lote 2, madurado durante 14 días, presentó unos valores semejantes a los otros tres lotes en un tiempo de maduración equivalente.

Los resultados obtenidos al final de la maduración son muy similares a los reseñados por Santamaría y col. (1992a) en diferentes marcas comerciales de chorizo de Pamplona, aunque la a_w fuera ligeramente mayor en aquéllos (0,95) que en éstos (0,93) al final del estufado. También son semejantes a los obtenidos a lo largo de la maduración por Stiebing y Rödel (1988) en embutidos de 60 mm de calibre, si bien los salchichones objeto del presente estudio tuvieron un calibre más reducido (30 mm). Una evolución semejante es la descrita por Baumgartner y col. (1980) en embutido Cervelat de 60 mm de calibre y madurado a 15°C durante 28 días. Astiasarán y col. (1990a) estudiaron la a_w de chorizos de picado de diferente grosor. Los valores de a_w de los salchichones del presente trabajo (de picado fino) se parecen más a los de los chorizos de picado grueso (0,89) de los autores antes citados que a la de los chorizos de picado similar (0,83), lo que se puede atribuir a que, en el presente trabajo, la temperatura de secado fue más baja (12°C frente a 15-18°C), perdiéndose una cantidad menor de agua.

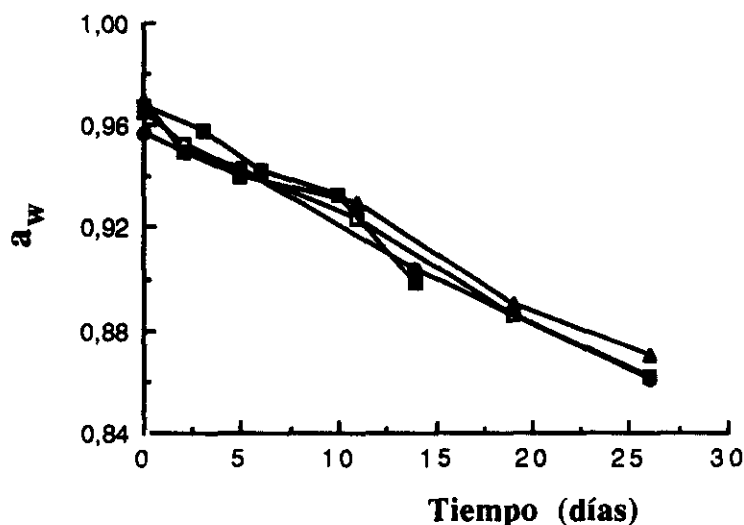


Figura III.2. Evolución de la actividad de agua (a_w) en los lotes de embutidos controles durante la maduración. Control 1 (□); control 2 (■); control 3 (▲); control 4 (●).

III.1.1.3. EVOLUCION DEL pH.

La evolución del pH de los controles a lo largo de la maduración se recoge en la figura III.3. En todos los casos se produjo un marcado descenso del pH en las primeras 48 horas de maduración, registrándose el valor mínimo entre los días quinto y undécimo, para sufrir posteriormente un ligero aumento hasta el final del proceso. Los valores iniciales fueron inferiores a 6,0 en tres lotes (1, 2 y 3) y algo superior (6,1) en el cuarto.

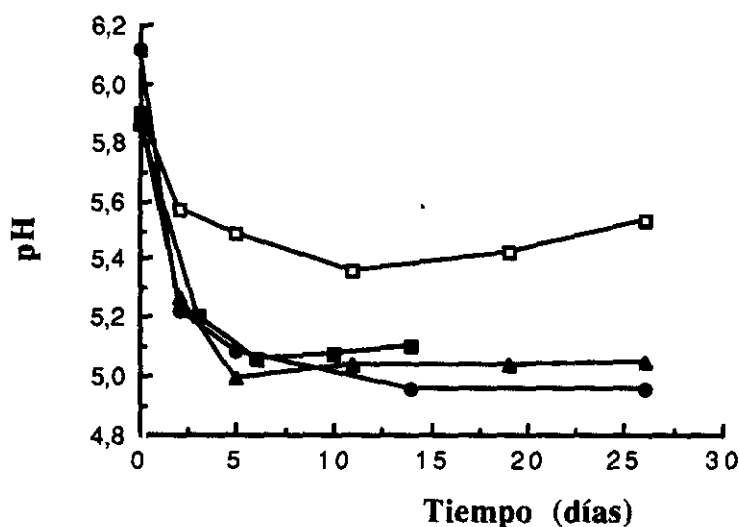


Figura III.3. Evolución del pH en los lotes de embutidos controles durante la maduración. Control 1 (□); control 2 (■); control 3 (▲); control 4 (●).

Los valores del pH que se registraron en el lote 1 fueron diferentes de los observados en el resto; la caída del pH fue más lenta y el valor menor (5,4) más elevado (alrededor de 0,4 unidades), lográndose a los 10 días de maduración. En la bibliografía se han descrito valores del pH de este orden (Ferrer y Arboix, 1986b; Lois y col., 1987; Astisarán y col., 1990a; García de Fernando y Fox, 1991) y, por tanto, pueden considerarse como normales. No obstante, resulta realmente extraño el comportamiento del lote 1 respecto a los demás, mucho más si se tiene en cuenta que todos los lotes se fabricaron en la misma industria. El pH final más elevado del lote 1 se debe, sin lugar a dudas, a una menor producción de ácido láctico

que, a su vez, podría derivar en principio de una tasa más baja de los microorganismos que componen la flora láctica. Sin embargo, esto no ocurrió; compárese a tal efecto la evolución de la flora microbiana en todos los lotes (figuras III.4 y III.5) y podrá concluirse que, en todos los casos, las tasas de dichas bacterias alcanzaron valores similares (algo superiores a 10^8 u.f.c./g). En consecuencia, hay que concluir que la flora que prevaleció en el lote 1 no produjo ácido láctico con la misma eficacia que las bacterias lácticas dominantes en los otros tres lotes. En este sentido, los lactobacilos de origen cárnico se han clasificado en acidúricos y no acidúricos en relación con el pH final al que pueden dar lugar (Shaw y Harding, 1984). Es aquí donde hay que buscar las causas de las diferencias observadas en el pH. En relación con este hecho, puede concluirse la conveniencia de añadir cultivos iniciadores para la fabricación industrial de embutidos (la industria en que se elaboraron los lotes utilizados en esta investigación no los adicionan) para controlar al máximo la producción.

Similares consideraciones pueden hacerse respecto al pH de la materia prima; en el lote 4 fue 0,3 unidades superior (6,1) a los otros tres (5,8), aunque al final fuera el normal. Es otro parámetro que conviene controlar en la producción industrial de embutidos.

En todos los casos se observó un ligero incremento en el valor del pH al final de la maduración. Lücke (1984) lo atribuye al aumento de la concentración de amoníaco y aminas. Demeyer y col. (1979) opinan, sin embargo, que no sólo se debe al aumento en la formación de amoníaco, sino también al aumento de la concentración de compuestos tampón y al descenso en la disociación de los electrolitos ya presentes.

La evolución de los valores del pH hallada en este trabajo es semejante a la reseñada por otros autores, tales como Mendoza y col. (1983) en chorizos fermentados a 20-22°C y madurados a 15°C (condiciones muy similares a las empleadas en los embutidos experimentales) y García de Fernando y Fox (1991) en embutidos fermentados a 30°C, aunque en este caso los valores finales (aproximadamente de 5,4) fueron más elevados que los observados en todos los lotes excepto el correspondiente al lote 1. Lois y col. (1987) describen una evolución y unos resultados similares a los de este trabajo en chorizos a los

que se les añadieron azúcares (pH final de 5,0), mientras que los valores correspondientes al lote elaborado de forma tradicional (sin adición de azúcares) por dichos autores fueron bastante más elevados (pH final de 5,7). Lo mismo sucedió en las experiencias con salchichón de Vich (sin carbohidratos) realizadas por Ferrer y Arboix (1986b). En los controles 2, 3 y 4 los valores de pH finales fueron menores que los citados por Gökalp (1986) en "soudjouk" turco (5,1-5,3), por Nagy y col. (1989) en salami húngaro (mayor de 5,75) y por Astiasarán y col. (1990b) en salchichón (6,0), y similares a los descritos por Acton y Dick (1976) en embutidos tipo "Thuringer", americano y salami (5,08, 5,09 y 5,02, respectivamente).

III.1.1.4. CENIZAS.

El contenido medio (media aritmética de las muestras tomadas en cada lote) de cenizas expresado en porcentaje de extracto seco de los controles fue de 9,43 %, 9,15 %, 8,99 % y 9,41%. Las pequeñas variaciones observadas entre los lotes se deben, probablemente, a ligeras modificaciones en la composición de la masa inicial. Estos resultados son ligeramente superiores a los obtenidos por Acton y Dick (1976) en diversos embutidos comerciales, por Barranco y col. (1985) y Domínguez y col. (1988) en chorizo, y por Cid y col. (1992b) en chistorra. Cifras algo más elevadas han sido citadas en salchichón de Vich por Ferrer y Arboix (1986b) y por Bandeira de Oliveira y col. (1992).

III.1.2. Evolución de la flora microbiana.

Las figuras III.4 y III.5 muestran la evolución de la flora microbiana total, la flora láctica y las micrococáceas de los controles de los cuatro lotes durante la maduración.

En las tasas iniciales de bacterias se observaron algunas diferencias entre las que conviene resaltar, de forma particular, las referentes a los viables totales y a la flora láctica. Dicho valor inicial en el lote 1 fue el mismo para ambos tipos de flora, lo que indica que,

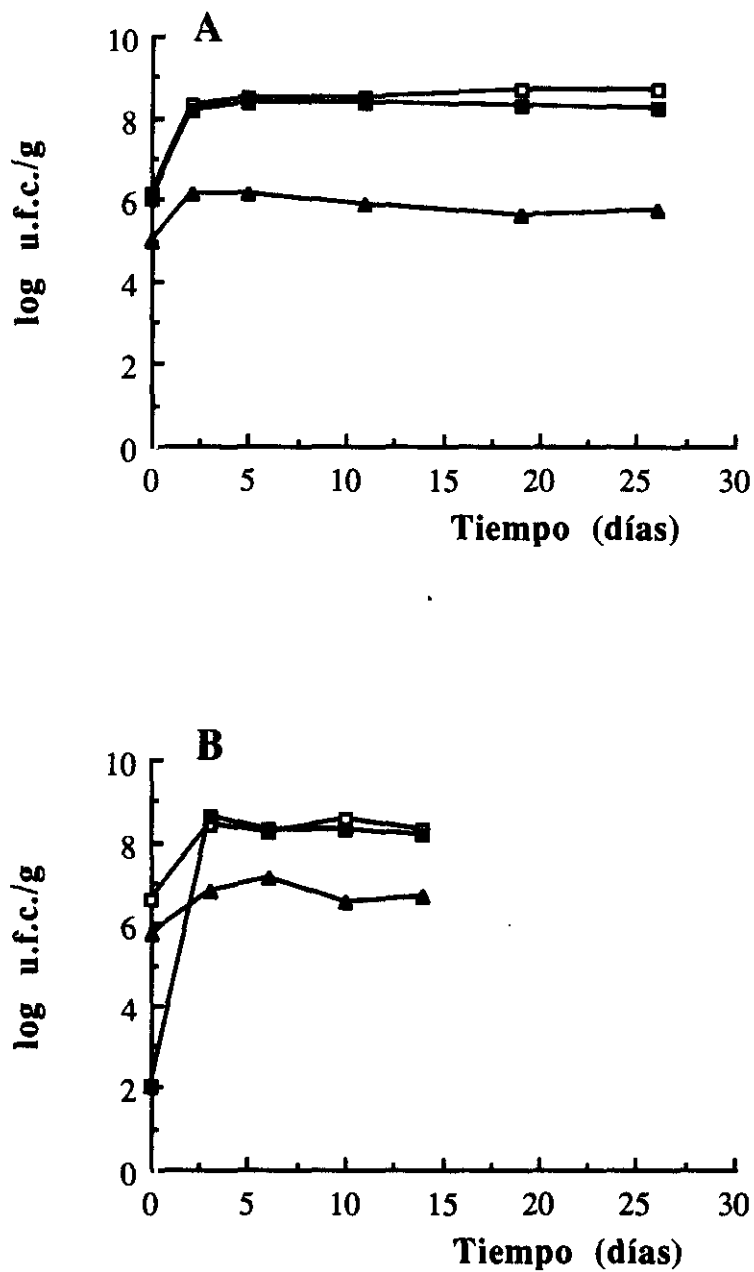


Figura III.4. Evolución de los microorganismos viables totales (□), de la flora láctica (■) y de las micrococáceas (▲) en los lotes de embutidos control. A: control 1; B: control 2.

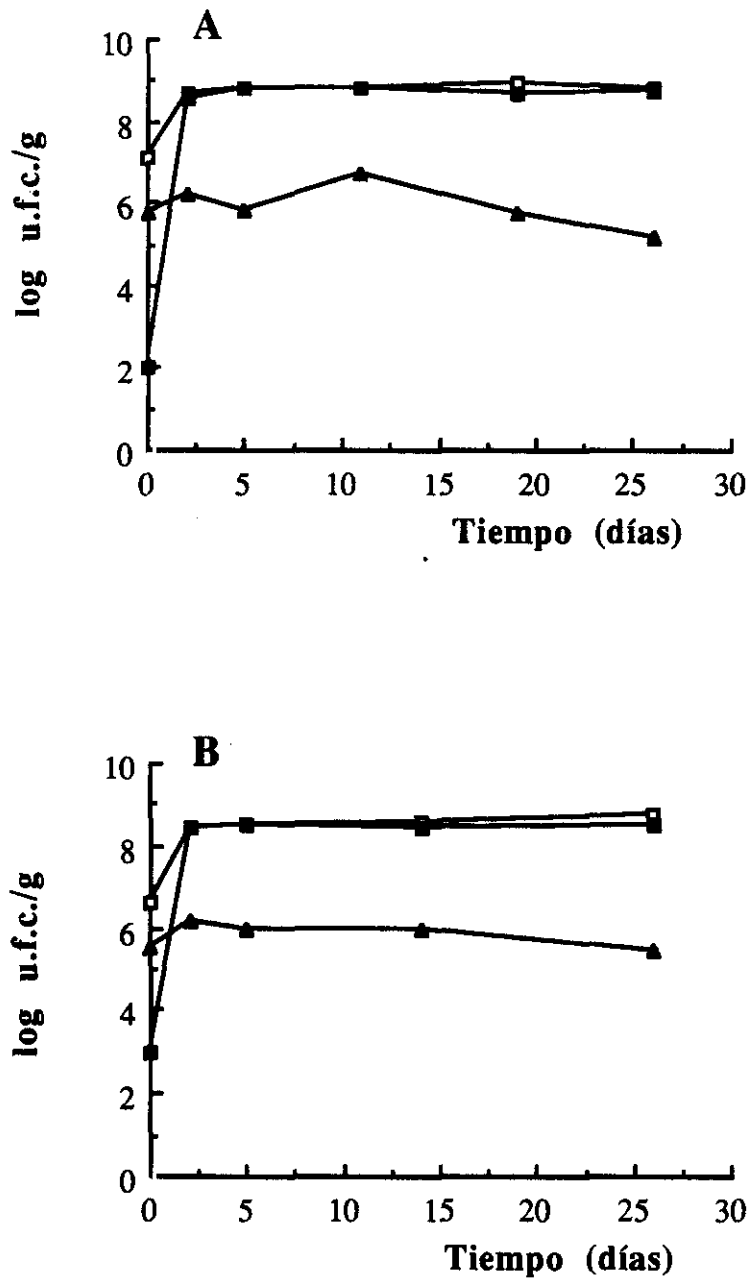


Figura III.5. Evolución de los microorganismos viables totales (□), de la flora láctica (■) y de las micrococáceas (▲) en los lotes de embutidos control. A: control 3; B: control 4.

desde el principio, las bacterias lácticas eran las dominantes. Sin embargo, no ocurrió así en los otros tres lotes, en los que se halló una tasa total de bacterias entre 10^6 - 10^7 u.f.c./g siendo la de la flora láctica mucho más baja, de 10^3 u.f.c./g en el lote 4 y por debajo de 10^2 u.f.c./g (inferior al umbral de detección del método) en los lotes 2 y 3. No obstante, en todos los lotes, los recuentos alcanzaron valores superiores a 10^8 tras la fase fermentativa, aumentando, obviamente, de forma más explosiva en los lotes 2, 3 y 4. Estas diferencias en los valores iniciales reflejan, de nuevo, el tipo de elaboración de embutidos, sin adición de cultivos iniciadores, que habitualmente practica la industria que colaboró en las investigaciones que se describen en la presente memoria. Si se hubieran añadido cultivos iniciadores, la tasa inicial de lactobacilos hubiera sido siempre del mismo orden. Por otra parte, la suma del número de bacterias hallado en ágar MSA (micrococáceas) y MRS (flora láctica) no dan cuenta del obtenido en PCA (flora total), ya que aquélla fue unas 10 veces menor. En consecuencia, hay que deducir que las bacterias responsables del recuento total en el día 0 son las presentes habitualmente en la carne fresca refrigerada, es decir, bacterias aerobias Gram negativas (McMeekin, 1982; Gill, 1982), aunque después se impongan los lactobacilos como reflejan la gráfica B de la figura III.4 y las dos de la figura III.5. Estas consideraciones respecto a la flora láctica no son válidas para las micrococáceas, ya que en todos los lotes mostraron valores iniciales alrededor de una unidad logarítmica menores que los alcanzados por los viables totales.

Independientemente de las tasas microbianas originales observadas, el comportamiento posterior de la flora fue similar; la tasa de micrococáceas se mantuvo en los mismos niveles originales o sufrió un aumento nunca superior a una unidad logarítmica y la de lactobacilos se incrementó de forma marcada en todos los lotes, pudiéndose catalogar dicho incremento como explosivo en los tres lotes (2, 3 y 4), que registraron tasas iniciales bajas. Estas variaciones al alza de la flora se observaron en las primeras 48 horas del proceso madurativo, justamente en la fase fermentativa donde coexisten temperaturas y a_w elevadas. Transcurrida esta primera etapa, los recuentos se estabilizaron hasta el final de la maduración.

La superposición de las gráficas del recuento total y flora láctica indica que ésta última es la responsable de aquel recuento y engloba, como diversos autores han demostrado (Sanz y col., 1988), a los lactobacilos.

La evolución de los recuentos una vez finalizada la fase fermentativa fue semejante a la reseñada por distintos autores, como Sesma y Rodríguez (1976) en chorizo de Pamplona, Mendoza y col. (1983), Selgas y col. (1988) y Sanz y col. (1988) en otros tipos de chorizo, Gökalp y Ockerman (1985) en embutidos turcos, Lücke (1986) e Incze (1987) en otro tipo de embutidos. Sin embargo, todos ellos salvo Sanz y col. (1988) y Selgas y col. (1988), observaron un descenso en los grupos microbianos en los últimos días del período madurativo, atribuyéndolo a las variaciones de temperatura, pH y a_w que se producen en los embutidos en los últimos estadios del secado. Este hecho no ha sido detectado en los salchichones experimentales analizados en este trabajo. Es posible que la disminución de la tasa de bacterias al final de la maduración dependa del tiempo de este proceso; si es superior a los 2-3 meses puede que sea más evidente.

Por lo que se refiere a las tasas microbianas alcanzadas, todas las muestras analizadas mostraron valores superiores a los encontrados por Acton y Dick (1976) en diversos embutidos comerciales, tanto para viables totales como para bacterias lácticas, y por Ferrer y Arboix (1986a) para todos los tipos de microorganismos. Por el contrario, el recuento de flora láctica fue muy similar al citado por Sanz y col. (1988) y Selgas y col. (1988) en embutidos españoles y por Lücke (1986) en salamis madurados de manera normal o lenta, y bastante inferior a los obtenidos en chorizo por Mendoza y col. (1983) y Domínguez y col. (1989a). Respecto a las micrococáceas, los recuentos fueron semejantes a los señalados por Wirth (1984) y todos los autores citados anteriormente, pero en ningún caso se convirtieron en la flora predominante, como se ha descrito, por ejemplo, en embutidos fermentados chinos (Savic y col., 1988; Guo y Chen, 1991).

III.1.3. Estudio de la proteólisis: evolución de las fracciones nitrogenadas.

III.1.3.1. NITROGENO TOTAL.

El contenido en nitrógeno total expresado sobre extracto seco se mantuvo constante, como era de esperar (las posibles pérdidas de nitrógeno volátil son insignificantes para que puedan detectarse), a lo largo de la maduración y en todas las muestras analizadas. Los resultados medios obtenidos fueron los siguientes:

- lote 1: 6,04 %
- " 2: 6,42 %
- " 3: 6,75 %
- " 4: 6,21 %

Las variaciones que se observaron entre los lotes pueden reflejar la heterogenidad del producto, aunque son tan pequeñas que se pueden considerar como similares.

Estos resultados se encuentran comprendidos entre los citados en la bibliografía, aunque también se han obtenido valores inferiores. Así, cifras situadas entre el 3 y el 5 % han sido reseñadas por Acton y Dick (1976) en diversos embutidos comerciales; en chorizo, salchichón y salami por Astisarán y col. (1990b) y Cid y col. (1992a) y en chistorra por Cid y col. (1992b). Domínguez (1988), en cambio, obtuvo valores medios del 6,48% para chorizos industriales, muy semejantes a los obtenidos en este trabajo, y del 5,27% en chorizos artesanales. Beriain y col. (1990) citan cifras medias superiores en casi todos los grupos de muestras tomadas en distintos momentos de la maduración, que llegan incluso hasta el 7% en el mismo producto.

El contenido en nitrógeno total depende de la formulación y, por tanto, los valores descritos por unos y otros autores no son comparables. Aquellos autores que han ofrecido valores bajos (por ejemplo, del 3%) corresponden a embutidos con poco contenido en carne y mucho en grasa, y viceversa.

III.1.3.2. NITROGENO SOLUBLE EN AGUA (NSA).

En la figura III.6 se recoge la evolución del nitrógeno soluble en agua, en términos de extracto seco, a lo largo de la maduración en los cuatro lotes control.

Los valores iniciales de NSA estuvieron comprendidos entre 1,04 gN/100g de extracto seco (lote 3) y 1,38 gN/100g (lote 2) y al final de la maduración se llegaron a tasas comprendidas entre 1,49 gN/100g (lote 1) y 1,11 gN/100g (lote 3).

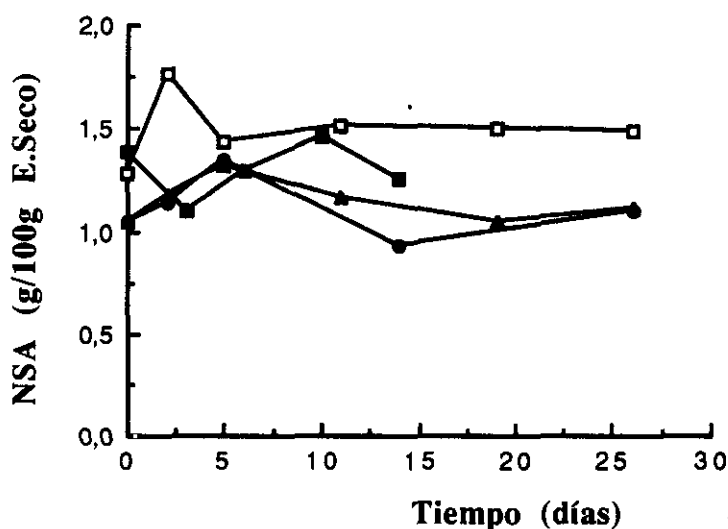


Figura III.6. Evolución del nitrógeno soluble en agua (NSA) en los embutidos controles durante la maduración. Control 1 (□); control 2 (■); control 3 (▲); control 4 (●).

En la evolución de la fracción NSA de cada uno de los lotes se observaron algunas fluctuaciones que se han considerado inherentes a la falta de homogeneidad de las muestras. Un análisis global de la evolución de los cuatro lotes indica que los valores hallados en cada punto de muestreo dieron lugar a gráficas que unas veces se superponen y otras se entrecruzan. Quizás, el lote 1 fue el que se desvió un poco de este comportamiento. En cualquier caso puede decirse, en términos generales, que la fracción NSA mostró una

evolución similar en los cuatro lotes, es decir, el NSA aumentó ligeramente a lo largo de la maduración, habiéndose calculado incrementos comprendidos entre el 7 y el 16% (tabla III.1) al tomar como referencia los valores iniciales.

Estas conclusiones son comparables, en términos generales, a los resultados obtenidos por otros autores. Así, Garriga y col. (1988) observaron también un aumento progresivo a lo largo de la maduración, hallando valores algo por encima de los iniciales aunque estos autores indicaron que en la fase fermentativa se produce un mayor incremento y disminuye después para mantenerse a niveles constantes hasta el final del proceso madurativo. Este comportamiento quizá sea comparable al recogido en la figura III.6 para el lote 1. Sin embargo, se ha preferido, en nuestro caso, no dar tanta importancia a ese valor, ya que dicho lote fue el único que se desvió de forma significativa de la evolución gradual del NSA observada en el resto de los lotes. Se ha considerado, pues, como un hecho ocasional. Los resultados de otros autores (García de Fernando y Fox, 1991) refuerzan esta opinión, dado que describen también un incremento continuo desde el principio hasta el vigésimo día de maduración.

III.1.3.3. NITROGENO NO PROTEICO (NNP).

La evolución del nitrógeno no proteico correspondiente a los controles se ha representado en la figura III.7. Los valores iniciales fueron de 0,54 (lote 1), 0,56 (lote 2), 0,47 (lote 3) y 0,63 (lote 4) gN/100g extracto seco.

Aunque se observaron algunas fluctuaciones en esta fracción a lo largo del período madurativo, sobre todo en los lotes 2 y 3, puede decirse con carácter general que la tendencia del NNP fue a ir aumentando progresivamente durante la maduración, hallándose, respecto a los valores iniciales, incrementos mayores (entre el 14 y el 80%) que los observados para el NSA (tabla III.1). Normalmente, estos porcentajes hay que tomarlos con cautela, ya que dependen estrechamente de los valores iniciales que se determinen, por lo que no se puede concluir categóricamente que existan tales diferencias entre los lotes. Por ejemplo, el 80,8%

TABLA III.1. Incremento (%) de diferentes fracciones nitrogenadas de los embutidos controles al final de la maduración.

Lote	NSA	NNP	NSF	NSS	NBVT
Control 1	16,4	29,6	14,8	212,3	69,1*
Control 2	8,7	14,3	13,8	157,7	118,9
Control 3	6,7	80,8	14,3	44,4	95,3
Control 4	5,8	31,2	20	66,4	122,1

Todos los datos se refieren al inicio del proceso, excepto: *Respecto al 2º día de maduración.

NSA: nitrógeno soluble en agua.

NNP: nitrógeno no proteico.

NSF: nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5%.

NSS: nitrógeno soluble en ácido sulfosalicílico al 5%.

NBVT: nitrógeno básico volátil total.

de incremento del NNP que se calculó para el lote 3 se debió al bajo contenido inicial (0,47 gN/100g) dado que la tasa final fue igual a la del lote 4. Quizá sea más preciso calcular el porcentaje de aumento medio de los cuatro lotes a partir de las medias aritméticas de los valores iniciales y finales. De este modo, se llega a un porcentaje de incremento medio para el NNP de alrededor del 40%.

La evolución del nitrógeno no proteico durante la maduración de los lotes control fue similar, en algunos lotes (1 y 4), a la descrita por otros autores, como Dierick y col. (1974), León Crespo y col. (1985) y Lois y col. (1987), quienes describen un aumento progresivo de los valores de NNP a lo largo de todo el proceso, y en otros (2 y 3) a la observada por Ferrer y Arboix (1986b) en el salchichón de Vich, en el que las tasas de esta fracción aumentaron en los 10-15 primeros días de maduración y después se mantuvieron prácticamente constantes hasta el final de la misma. Domínguez (1988) observó pocos cambios en esta fracción, especialmente en chorizos artesanales. En los chorizos industriales sí existió un aumento marcado en la fase fermentativa (primeras 48 horas) aunque después las oscilaciones fueron pequeñas.

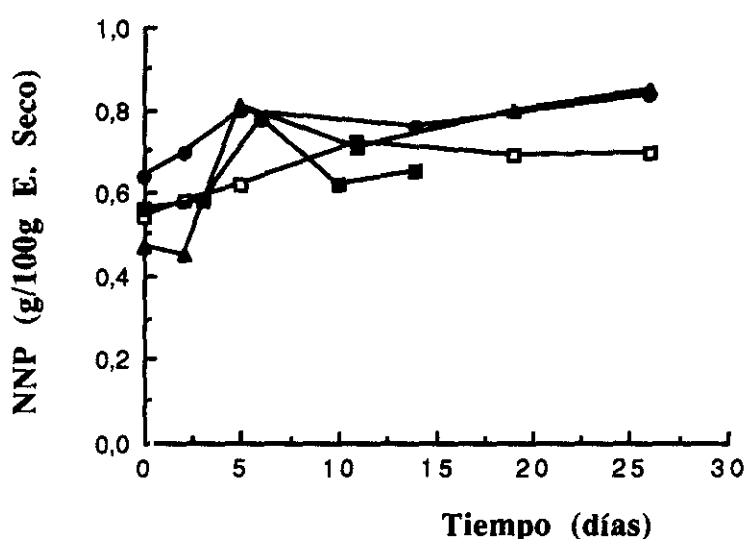


Figura III.7. Evolución del nitrógeno no proteico (NNP) en los embutidos controles durante la maduración.
Control 1 (□); control 2 (■); control 3 (▲); control 4 (●).

Por lo que se refiere a los valores absolutos de NNP alcanzados por los embutidos fueron similares a los descritos por Dierick y col. (1974), por DeMasi y col. (1990) en embutidos fermentados que habían sufrido un calentamiento después de la fermentación y también semejantes a los reseñados por Domínguez (1988) en chorizos industriales, por Astiasarán y col. (1990b) en salchichón y salami y por Beriain y col. (1990) en el chorizo, aunque en este último caso la evolución fue distinta, ya que las tasas iniciales fueron mayores que las observadas en fases de maduración más tardías. En los chorizos artesanales analizados por Domínguez (1988), sin embargo, las cifras fueron marcadamente inferiores, tanto respecto a los chorizos industriales a los que antes se ha hecho referencia como también a los embutidos estudiados en este trabajo. Lois y col. (1987) y Santamaría y col. (1992b) también obtuvieron valores más bajos en chorizo y en chorizo de Pamplona comercial, respectivamente. Por el contrario, León Crespo y col. (1985) en chorizo y Ferrer y Arboix (1986b) en el salchichón de Vich citan cantidades superiores a las obtenidas en los controles analizados en el presente trabajo, incluso en la masa inicial.

El control 2 presentó un recuento de micrococáceas entre 1 y 1,5 unidades logarítmicas superior a los de los otros lotes; cabría esperar unas tasas superiores de NNP dado que se ha demostrado (Selgas, 1985) que algunas cepas de esta familia están dotadas de una actividad proteolítica importante. Sin embargo, dicho lote mostró un contenido en NNP similar al obtenido en el control 1 y algo inferior al de los controles 3 y 4. Parece que las micrococáceas existentes en estos embutidos no ejercieron una gran actividad proteolítica, tal como señalan algunos autores (Giolitti, 1960; Montel y col., 1992), o bien que las cepas presentes en ellos no poseían esta capacidad que sólo es característica de algunas cepas de micrococáceas (Selgas, 1985).

III.1.3.4. NITROGENO SOLUBLE EN ACIDO FOSFOTUNGSTICO AL 5% (NSF).

La figura III.8 muestra la evolución del nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5

% a lo largo de la maduración en los lotes control. Los valores iniciales y finales fueron, respectivamente, de 0,27 y 0,31 gN/100g de extracto seco en el control 1; 0,29 y 0,33 gN/100g en el control 2; 0,35 y 0,40 gN/100g en el control 3 y 0,34 y 0,42 en el 4. Los porcentajes de incremento a lo largo de la maduración (tabla III.1) fueron semejantes (alrededor del 14%) en los 3 primeros lotes y algo superior en el 4 (un 20%).

La evolución de la fracción NSF fue paralela en cada lote a la observada para el NNP (compárense las gráficas de ambas fracciones correspondientes a cada control). Por ejemplo, el lote 2 mostró un incremento del NNP en la primera semana y posteriormente disminuyó, lo que también ocurrió para el NSF. Asimismo, los valores del NNP del lote 1 fueron los que alcanzaron las tasas más bajas, observándose un hecho similar para la fracción NSF. Lo mismo podría decirse respecto al lote 4. Las muestras de los primeros días del lote 3 fueron solamente las que presentaron una evolución algo discordante, pero sólo durante la fase fermentativa, después se ajustó al mismo modelo que en el resto de los lotes. Quiere esto decir que la generación de péptidos pequeños y aminoácidos va paralela a la fragmentación de las proteínas para rendir péptidos solubles en ácido tricloroacético al 12,5%.

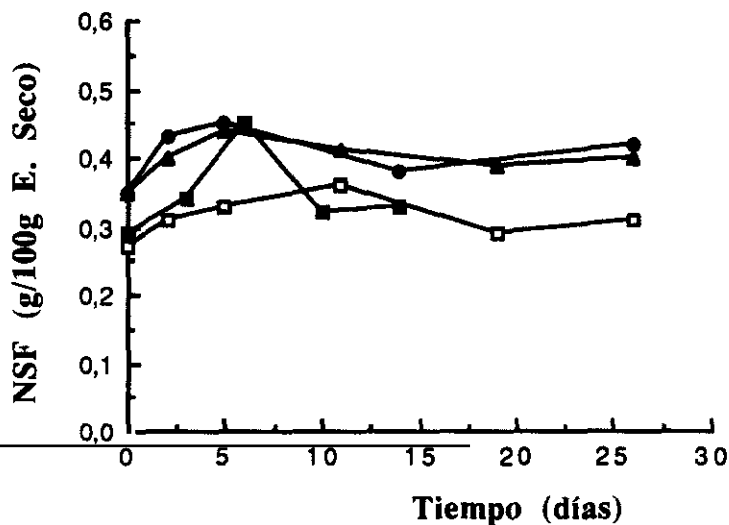


Figura III.8. Evolución del nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5% en los embutidos controles durante la maduración. Control 1 (□); control 2 (■); control 3 (▲); control 4 (●).

De entre toda la bibliografía revisada, solamente se han encontrado datos comparables en el trabajo de García de Fernando y Fox (1991). La evolución registrada por estos autores es bastante similar a la obtenida en los embutidos a que se refiere el presente apartado, no existiendo en ambos casos grandes oscilaciones a lo largo de la maduración. No obstante, los contenidos en NSF (referidos a nitrógeno total) citados por estos autores aumentaron sólo desde, aproximadamente, el 5,5 % inicial hasta el 6,5 %, mientras que en el lote 1 la tasa pasó de un 4,5 % inicial al 6 % final y en el 2 desde el 4 % hasta el 7 %. Sin embargo, en el lote 3 sólo aumentó desde el 5,2 % hasta el 5,9 %, siendo, por tanto, inferior al citado por ellos. Similares consideraciones pueden hacerse para el lote 4, ya que la gráfica de NSF que se obtuvo se superpone, prácticamente, con la del lote 3. En el presente trabajo, además, el incremento en NSF fue similar al de las otras fracciones nitrogenadas superiores, mientras que García de Fernando y Fox (1991) observaron un aumento menos marcado en el NSF que el que presentaron las otras fracciones nitrogenadas.

III.1.3.5. NITROGENO SOLUBLE EN ACIDO SULFOSALICILICO AL 5% (NSS).

La representación gráfica de la evolución del nitrógeno soluble en ácido sulfosalicílico al 5% en los controles a lo largo de la maduración se recoge en la figura III.9. Los resultados se han expresado en mgN/100g de extracto seco.

En todos los lotes se obtuvo un incremento del NSS durante la maduración, cuya evolución, sin tener en cuenta los valores absolutos, fue muy similar a la descrita por otros autores (Dierick y col., 1974; Ferrer y Arboix, 1986b; Beriain y col., 1990; García de Fernando y Fox, 1991). Sin embargo, el aumento fue, en términos absolutos, mayor en los embutidos que presentaron un valor inicial menor (lotes 1 y 2) que, partiendo de niveles de alrededor de 100 mg/100g E.S., llegaron a tasas de alrededor de 225 mg/100g E.S. (lote 2) y de algo superior a los 250 mg (lote1), pero hay que tener presente que este último lote se maduró sólo durante 15 días. Puede decirse, pues, que ambos se comportaron de forma

similar. Por otra parte, en los otros dos lotes (el 3 y 4), tanto la evolución como los valores absolutos fueron prácticamente iguales (de la misma forma que ocurrió para el NSF), como puede deducirse de la práctica superposición de las gráficas obtenidas. Los incrementos detectados en ambos fueron de menor cuantía que en los lotes 2 y 3, ya que se partió de niveles en torno a 130 mg/100g E.S. y apenas se llegó a los 200 mg/100g E.S. Debido a estas diferencias, los porcentajes de incremento a lo largo de la maduración fueron distintos (tabla III.1), habiéndose calculado para los lotes 1 y 2 valores del 212 y 157% y para los otros dos inferiores al 70%.

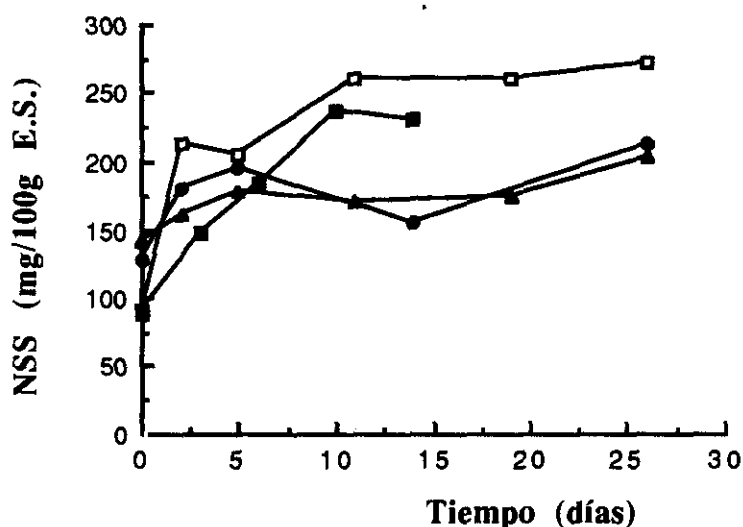


Figura III.9. Evolución del nitrógeno soluble en ácido sulfosalicílico al 5% en los embutidos controles durante la maduración.
Control 1 (□); control 2 (■); control 3 (▲); control 4 (●).

Quizás, el hecho más relevante en relación con los resultados del NSS es que el lote 1 fue el que presentó los valores más elevados y, sin embargo, fue el que mostró las tasas más bajas de NSF (figura III.8), siendo muy parecidas para ambas fracciones, mientras que los otros lotes mostraron valores de NSS más bajos que los de NSF. Como el NSF indica el contenido de sustancias nitrogenadas de peso molecular inferior a 600 d. (Jarret y col., 1982)

y la fracción NSS detecta, en la práctica, sólo aminoácidos libres (Reiter y col., 1969), esto quiere decir que en el lote 1 casi la totalidad de las sustancias que componen la fracción NSF corresponde a aminoácidos libres mientras, que en los otros lotes, además de estas sustancias, existen también péptidos pequeños (menores de 600 d).

En relación a los resultados de otros autores, cabe decir que los valores iniciales del NSS en los controles 1 y 2 fueron inferiores a los citados en la bibliografía revisada, mientras que los del control 3 fueron semejantes. Pese a esta diferencia en los valores iniciales, todos los embutidos alcanzaron las tasas mencionadas por Dierick y col. (1974) en embutidos belgas, por Domínguez (1988) en chorizos industriales y por Astiasarán y col. (1990c) en chorizo de picado fino. Astiasarán y col. (1990b) obtuvieron contenidos ligeramente mayores al final de la maduración en chorizo, salchichón y salami a los observados en el presente trabajo, aunque hay que tener en cuenta que los valores iniciales eran claramente superiores a los aquí obtenidos. Santamaría y col. (1992b), por otra parte, describen valores finales semejantes a estos controles en dos de las seis marcas comerciales de chorizo de Pamplona analizadas, mientras que las restantes presentaron tasas superiores a los 300 mgN/100g de extracto seco. Niveles muy superiores de NSS han sido detectados por Ferrer y Arboix (1986b) en salchichón de Vich desde el principio de su maduración, al igual que los descritos por Beriain y col. (1990) en chorizo, donde llegaron a alcanzar 484 mgN/100g de extracto seco a las 4 semanas de maduración. Estos resultados distan mucho, sin embargo, de los obtenidos por Cantoni y col. (1985) en salamis italianos, en los que se detectaron 1949 mg/100g de materia seca.

En el extremo opuesto, Cid y col. (1992b) han descrito valores muy inferiores en chistorra (140 mg/100g de extracto seco), pero hay que tener en cuenta el corto tiempo de maduración que sufre este tipo de embutido, prácticamente sólo la fermentación, e incluso la necesidad de mantenerlo en refrigeración tras su fabricación; esos valores son similares a los de los lotes 3 y 4 al principio de la maduración.

III.1.3.6. NITROGENO BASICO VOLATIL TOTAL (NBVT).

La figura III.10 muestra la evolución del nitrógeno básico volátil total durante el período madurativo de los embutidos controles. Los resultados se han expresado en mgN por 100g de extracto seco.

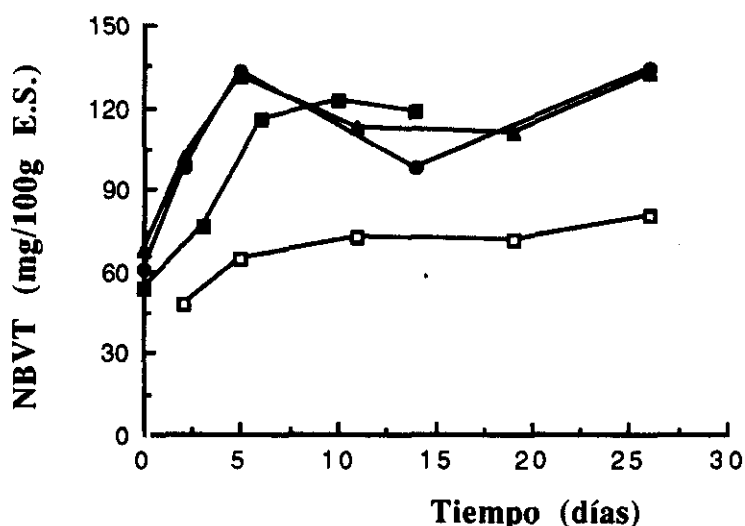


Figura III.10. Evolución del nitrógeno básico volátil total (NBVT) en los embutidos control durante la maduración.
Control 1 (□); control 2 (■); control 3 (▲); control 4 (●).

La evolución fue similar en los lotes 2, 3 y 4. Los valores de NBVT experimentaron un aumento más acusado hasta el quinto día de la maduración, descendiendo o manteniéndose luego constantes o mostrando sólo un ligerísimo incremento hasta el final de las respectivas maduraciones. En el lote 1, sin embargo, fue más gradual, manteniéndose siempre a niveles inferiores (hacia la mitad) de los alcanzados en el resto de los lotes.

Una evolución similar a la descrita para los lotes 2, 3 y 4 ha sido citada por Garriga y col. (1988) en salchichones y por Domínguez (1988) en chorizos industriales, mientras que el incremento fue más gradual en los artesanales analizados por dicho autor, al igual que el descrito por Lois y col. (1987) y por Dierick y col. (1974), teniendo en cuenta que sólo se

han considerado los resultados obtenidos por estos autores durante un período de tiempo similar al de maduración utilizado en el presente trabajo.

En el lote 1 no se pudo cuantificar el NBVT presente en la masa de los salchichones previa a la embutición (día 0 del muestreo) debido a que era inferior al umbral de detección de la técnica empleada. En los otros casos sí pudo hacerse, alcanzando valores entre 54 y 68 mgN/100g de materia seca. Los resultados obtenidos en todos los lotes controles aumentaron aunque en diferente cuantía, siendo notablemente mayores en los lotes 2, 3 y 4 con incrementos en torno o superiores al 100%, aunque hay que tener en cuenta que el incremento calculado en el lote 1 (69%) se refiere al segundo día de maduración, dado que el contenido inicial se encontraba por debajo del umbral del método. Es probable que el incremento real sea semejante al de los otros embutidos, es decir, alrededor del 100% (tabla III.1).

En los procesos madurativos, el amoníaco se genera por desaminación, vía microbiana, de los aminoácidos que rinden dicha sustancia y el α -cetoácido correspondiente. De hecho, Garriga y col. (1988) han observado que la cantidad de amoníaco en los embutidos se correlacionaba significativamente con la tasa de lactobacilos y micrococos. Por otra parte, es bien sabido que el amoníaco en medio alcalino se disipa, mientras que se retiene en medio ácido. Quizá, las tasas más bajas de este compuesto que se han detectado en el lote 1 pueden explicarse teniendo en cuenta las consideraciones anteriores. El lote 1 fue el único que desde el principio tuvo una tasa de lactobacilos elevada (del orden de 10^6 u.f.c./g) en comparación con los otros tres lotes, en los que estuvo comprendido entre 10^2 y 10^3 u.f.c./g (figuras III.4 y III.5). En estos tres lotes se ha observado también que la caída del pH fue más profunda (figura III.3) y que el aumento de NBVT se produjo de forma más acusada en los 5 primeros días de maduración (figura III.10) coincidiendo con el incremento explosivo de la tasa de lactobacilos. Es posible que dichas bacterias desaminen los aminoácidos libres de forma intensa durante su crecimiento logarítmico y de ahí que se detecte un incremento de

amoníaco sobre todo en la fase fermentativa. En el lote 1, como el incremento masivo de los lactobacilos ocurrió ya en la carne, el amoníaco pudo haberse disipado en su mayoría (no se detectó en el día 0) antes de embutir la masa, coincidiendo con un pH elevado, en torno a 6 (fig III.3). Además, se dió también la circunstancia de que en este lote, como se ha dicho anteriormente, el pH cayó menos, lo que puede justificar una mayor volatilización de amoníaco y, en consecuencia, la detección del NBVT a niveles más bajos que en los otros lotes.

En cuanto a las cantidades de NBVT obtenidas en el presente trabajo, hay que decir que fueron superiores a las citadas por Domínguez (1988) en chorizos artesanales, y similar a las obtenidas en los chorizos industriales analizados por esta autora en relación con el lote 1 pero menores que los de los lotes 2, 3 y 4. Otros autores ofrecen datos referentes sólo al contenido de NH_3 pero el NBVT está formado mayoritariamente por este compuesto y, por lo tanto, los resultados son comparables. Así, los resultados hallados en este trabajo fueron mayores que los reseñados por Langner (1972), que obtuvo 16 mgN/100g de extracto seco; por Dierick y col. (1974), con valores de 72 mgN/100g de materia seca a los 36 días de maduración en embutidos belgas; o por Lois y col. (1987) en chorizo. Ferrer y Arboix (1986b) citan tasas mucho mayores (303 mgN/100g) en el salchichón de Vich, pero hay que considerar que el período de maduración fue de 12 meses; a los 2 meses de maduración sólo alcanzaba los 99 mgN/100g. Asimismo, valores más semejantes a los obtenidos en el presente trabajo son los señalados por Cantoni y col. (1985) en el salami (118 mg/100g de extracto seco), pero también con un período madurativo más prolongado.

III.1.3.7. AMINOACIDOS LIBRES.

Los resultados obtenidos en la determinación de los aminoácidos libres durante la maduración, expresados en mg de aminoácido por 100g de extracto seco, se recogen en las tablas III.2 y III.3.

Si se comparan entre sí, se puede observar que las tasas de los diferentes aminoácidos

TABLA III.2. Cambios en el contenido en aminoácidos libres (mg/100g E.S.) en los lotes controles 1 y 2 durante la maduración.

LOTE	Control 1						Control 2				
	0	2	5	11	19	26	0	3	6	10	14
Asp	47	57	77	72	95	83	39	7	13	23	17
Glu	72	73	98	90	70	80	59	96	105	138	141
Hpr	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Asn + Gly	39	33	30	38	30	30	44	47	42	46	50
Ser + Gln	15	16	14	24	22	28	10	14	15	18	17
His/His+Thr*	190	216	226	292	247	232	242	252	254	295	299
Thr	38	81	84	61	58	54					
Ala	176	96	92	189	161	147	69	50	55	64	62
Pro	39	53	29	125	89	104	11	24	27	31	35
Arg	11	59	64	32	23	32	Tr	11	12	21	18
Cys **							33	10	39	24	23
Tyr	12	7	ND	ND	ND	ND	25	26	24	16	16
Val	18	33	27	34	35	33	27	48	49	56	55
Met	22	47	35	24	18	19	8	11	13	22	20
Ileu	12	24	23	25	25	26	16	22	29	22	20
Leu	13	34	33	48	43	48	18	39	46	68	65
Phe	11	21	20	26	19	27	11	16	29	42	59
Trp	14	14	26	32	21	29	Tr	33	49	66	59
Lys	14	25	30	47	51	54	18	27	23	56	45
TOTAL	743	889	908	1159	1007	1026	630	733	824	1008	1001

ND: no detectado ; Tr: trazas

* Control 1: His; control 2: His + Thr

** Sólo se determinó en el control 2.

Los valores encuadrados corresponden a los aminoácidos que más aumentaron a lo largo de la maduración.

Los valores en negrita corresponden a los aminoácidos predominantes en la masa original y al final del proceso madurativo.

TABLA III.3. Cambios en el contenido en aminoácidos libres (mg/100g E.S.) en los lotes controles 3 y 4 durante la maduración.

LOTE	Control 3						Control 4				
	0	2	5	11	19	26	0	2	5	15	26
Asp	Tr	Tr	41	63	69	62	Tr	24	Tr	45	49
Glu	134	226	322	386	440	386	148	332	260	268	318
Hpr	11	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	ND	ND	ND	Tr	Tr
Asn + Ser	Tr	18	14	Tr	19	22	21	34	29	35	62
Gly + Gln	68	57	67	68	55	51	96	115	91	78	105
His	210	230	269	312	293	287	229	361	260	227	346
Thr	Tr	24	30	35	53	56	20	36	28	52	91
Ala	65	74	130	135	138	132	81	148	127	112	209
Pro	33	41	52	70	72	67	46	93	78	73	118
Arg	24	Tr	10	Tr	Tr	Tr	28	ND	ND	19	Tr
Cys	97	97	88	109	179	200	51	Tr	40	29	44
Tyr	24	Tr	29	25	15	14	18	Tr	Tr	Tr	Tr
Val	33	41	67	83	99	86	32	62	57	65	108
Met	46	12	19	30	36	36	18	25	19	23	31
Ileu	26	28	50	61	71	65	20	39	39	47	79
Leu	34	52	107	129	145	124	36	94	94	101	178
Phe	26	31	58	73	79	67	19	38	48	52	86
Trp	15	31	50	73	74	66	36	37	9	10	8
Lys	27	72	94	133	149	129	80	121	99	88	169
TOTAL	873	1034	1941	2302	1986	1850	979	1559	1278	1324	2001

ND: no detectado ; Tr: trazas

Los valores encuadrados corresponden a los aminoácidos que más aumentaron a lo largo de la maduración.

Los valores en negrita corresponden a los aminoácidos predominantes en la masa original y al final del proceso madurativo.

que mostraron los controles fueron, a veces, bastante dispares, tanto al principio como al final de la maduración, al igual que sus incrementos. En el lote 1 el aminoácido predominante al inicio del proceso fue His, seguido de Ala y, más lejos, en orden decreciente, Glu, Asp, Pro y Asn+Gly. El resto mostró tasas inferiores a 25 mg/100g E.S. Al final de la maduración las cifras más elevadas fueron las de los mismos aminoácidos pero en diferente orden: His, Ala, Pro, Asp y Glu. Sin embargo, los mayores incrementos se detectaron en Lys, Leu, Arg y Pro, que se multiplicaron por un factor, respectivamente, de 3,8; 3,7; 2,9 y 2,7. No obstante, hay que tener presente que estos factores se refieren a valores al final de la maduración y que en muchos casos los máximos se produjeron en etapas anteriores de la misma. La Tyr fue el único aminoácido que decreció durante el proceso madurativo llegando a desaparecer.

Los aminoácidos mayoritarios en el control 2 al inicio de la maduración fueron His+Thr, Ala, Glu, Asn+Gly y Asp. Al final cambiaron algunos de ellos: His+Thr, Glu, Leu, Ala, Phe y Trp. Los aumentos más notables se detectaron en Phe (x5,3), Leu (x3,6), Pro (x3,2), Lys (x2,5) y Met (x2,5). En este lote, al igual que en el anterior, sólo disminuyó la Tyr, aunque siempre se detectó en cantidades mensurables.

En el control 3 predominaron His, Glu, Cys, Gly+Gln y Ala en la masa inicial, mientras que al final mostraron los valores superiores, en el orden en que se citan, Glu, His, Cys, Ala y Lys. Los mayores incrementos se observaron, no obstante, en Lys (x 4,7), Trp (x4,4), Leu (x3,6), Glu (x2,8) y Val (x2,6). La Tyr mostró una evolución igual a la de los otros dos lotes pero, al igual que en el lote 2, siempre pudo medirse.

Los aminoácidos más abundantes en la masa inicial del lote 4 fueron His, Glu, Gly+Gln, Ala y Lys, predominando al final de la maduración His, Glu, Ala, Leu y Lys. Los incrementos más elevados al final del proceso se observaron en Leu (x4,9), Thr (x4,5), Phe (x4,5), Ileu (3,9) y Val (x3,4). La Tyr también descendió y, en las últimas etapas de la maduración, sólo pudo detectarse en cantidades trazas.

En los cuatro controles aparecen entre los aminoácidos predominantes en la masa

inicial Ala y Glu, al igual que indican Langner (1969), Cantoni y col. (1974), tanto en salami tipo "Campagnolo" como tipo "Varzi", Dierick y col. (1974) en embutidos belgas y DeMasi y col. (1990) en embutidos tipo americano. La presencia de Glu entre los aminoácidos mayoritarios no es de extrañar, ya que en la fabricación industrial de embutidos se emplea a veces glutamato como aditivo con objeto de potenciar el sabor y aroma. La presencia de Ala como segundo aminoácido más abundante, como ocurrió en los controles 1 y 2, ha sido también puesta de manifiesto por Niinivaara y col. (1961), Körmendy y Gantner (1962) y por Stanculescu y col. (1970). A este respecto hay que decir que la alanina es uno de los aminoácidos más abundantes en la carne de cerdo (Nishimura y col., 1988). La His fue el aminoácido que apareció en mayor cuantía en los cuatro lotes. Otros autores (Domínguez y col., 1989b; DeMasi y col., 1990) han señalado que la Gln es uno de los aminoácidos predominantes en la masa inicial. Sin embargo, en este estudio no se ha detectado una cantidad importante del mismo, aún teniendo en cuenta que siempre eluyó junto con otros aminoácidos (con Ser en los lotes 1 y 2, y con Gly en 3 y 4).

Para facilitar el análisis del comportamiento de cada aminoácido se han incluido en un rectángulo aquellos que más aumentaron a lo largo de la maduración. La evolución de los distintos aminoácidos fue, en ocasiones, distinta en cada lote, lo que no permitió establecer un patrón común a la mayoría de ellos. No obstante, puede decirse de forma general que todos los aminoácidos aumentaron, en mayor o menor cuantía, durante la maduración, excepto la Tyr, que fue el único aminoácido que en todos los lotes mostró una tendencia al descenso. Este efecto está probablemente relacionado con el metabolismo de dicho aminoácido por los lactobacilos, ya que se ha demostrado (Edwards y col., 1987) que algunas especies (*L. divergens* y *L. carnis*) y ciertas cepas de lactobacilos acidúricos de origen cárnico ("cluster" 2 de Shaw y Latty, 1982) descarboxilan la tirosina para rendir tiramina. De forma opuesta, en quesos en cuya maduración participan activamente la flora láctica (lactococos y lactobacilos) siempre se ha observado el incremento gradual de Tyr (Ali, 1960; DoNgoc y col., 1971) incluso en los de maduración muy larga, como el manchego

(Ordóñez y Burgos, 1980). Quizás pueda emplearse este hecho como un argumento adicional para apoyar la opinión de algunos autores (Sanz y col., 1988) de que los lactobacilos de origen cárnico son fisiológicamente diferentes de los de origen lácteo, lo que ayuda a explicar el poco éxito que se ha tenido en el empleo de los de origen lácteo como cultivos iniciadores para la fabricación de productos cárnicos fermentados (Dubois y col., 1973).

Los aminoácidos que mostraron un comportamiento más regular y siempre con tendencia a aumentar fueron Lys, Leu, Phe, Val, Pro, Thr y Glu, aunque la abundancia y los porcentajes de incremento en cada lote fueron variables. El Trp fue el que mostró una evolución más irregular, dado que un lote (el 4) disminuyó de una forma clara, mientras que en los otros lotes aumentó gradualmente y en uno de ellos (el lote3) el valor inicial de este aminoácido fue el que se multiplicó por uno de los factores más elevados (x4,4).

Numerosos autores (Langner, 1969; Dierick y col., 1974; Cantoni y col., 1974; DeMasi y col., 1990) han detectado un incremento general en el contenido en aminoácidos libres de los embutidos. No obstante, Domínguez y col. (1989b) obtuvieron evoluciones muy variables, con un número de aminoácidos que descendieron muy semejante al de los que aumentaron, tanto en chorizos artesanales como industriales. Dierick y col. (1974) observaron una disminución bastante considerable del Glu presente inicialmente en los embutidos. Estos autores lo atribuyen a una descarboxilación, al menos parcial, para dar lugar a ácido γ -amino butírico, lo que les lleva a cuestionar su utilidad como aditivo mejorante del sabor y aroma, como ya había apuntado previamente Langner (1972). El descenso en la cantidad de Glu ha sido detectado también por otros autores, como en el salami tipo "Varzi" (Cantoni y col., 1974) y en uno de los lotes de chorizos artesanales que analizaron Domínguez y col. (1989b). La evolución ascendente observada en este trabajo coincide, no obstante, con los resultados de otros autores (Reuter y col., 1968; Langner, 1969; DeMasi y col., 1990).

El descenso de la Arg (que sólo ocurrió en los lotes 3 y 4) durante la maduración ha sido puesto de manifiesto también por otros investigadores (Cantoni y col., 1974; DeMasi y

col., 1990) y se ha atribuido a una desimidación del aminoácido para rendir Orn (DeMasi y col., 1990). Este efecto se ha descrito también durante la maduración de diversos tipos de queso (Schormuller y Tanzler, 1959; Ali, 1960; Ordóñez y Burgos, 1980) e, igualmente, se ha asociado a actividades arginina-desimidasa de origen microbiano (Schormuller y Tanzler, 1959). Asimismo, se ha demostrado en carne envasada al vacío (Dainty y col., 1986) que para la formación de putrescina es necesario una acción colaborativa entre lactobacilos y enterobacterias, los primeros transformarían la Arg en ornitina y las últimas producirían la diamina a partir del aminoácido. En el caso del queso, al no haber enterobacterias no se puede producir la transformación de ornitina a putrescina. En cualquier caso, el descenso de Arg no es un fenómeno de carácter general o la producción de Arg supera a su desimidación, dado que en los lotes 1 y 2 se observó un aumento del aminoácido, al igual que han descrito otros autores (Langner, 1969; Domínguez y col., 1989b).

Los valores finales de los aminoácidos en los lotes control fueron también variables en relación a los obtenidos por distintos autores, aunque hay que tener en cuenta que se refieren a otros tipos de embutidos fermentados. También variaron de unos embutidos a otros. Así, las cifras obtenidas por Cantoni y col. (1974) en el salami tipo "Campagnolo" fueron similares en Ala, Val, Ile, Tyr y Lys, y menores en el resto de los aminoácidos respecto al lote 1. Sin embargo, el lote 2 sólo mostró tasas semejantes en Gly, Asn, Met e Ile, siendo menores las de Ala y Leu, y mayores en el resto. El lote 3 presentó valores superiores en todos los aminoácidos menos en Val y Arg, que fueron semejantes, y en Ser+Asn, que fueron menores. El lote 4 mostró, por otra parte, valores siempre superiores a los reseñados por estos autores, excepto en Met, que fueron similares.

Las diferencias también fueron grandes en relación a los resultados de DeMasi y col. (1990). Estos autores encontraron cantidades mayores de Leu, Tyr, Phe y Ser+Gln, similares de Glu, Met, Val e Ile e inferiores de Asp, His, Lys, Arg, Trp, Thr y Ala respecto a las observadas en el lote 1. En el lote 2, sin embargo, los contenidos fueron mayores en todos los aminoácidos excepto en Leu y Ser+Gln, que fueron inferiores, y similares en Asp,

His, Ala, Met, Ile y Tyr respecto a los descritos por estos autores. Los valores obtenidos en el lote 3 fueron en general más elevados, menos los de Arg y Tyr, que fueron semejantes, y los de Gly+Gln, que fueron más bajos. Esto mismo ocurrió con el lote 4, sólo que en éste la cantidad de Gly+Gln fue más elevada que la citada por DeMasi y col. (1990). En este caso, la variación tan amplia observada puede que derive de las diferentes actividades metabólicas durante la fabricación, dado que estos autores trabajaron con embutidos de tipo americano, los cuales suelen elaborarse con microorganismos del género *Pediococcus* como cultivos iniciadores, mientras que a los embutidos europeos se les añaden otras bacterias lácticas, principalmente lactobacilos. También hay que tener en cuenta que se emplean temperaturas elevadas en la fermentación y, además, en este caso los embutidos se someten a un calentamiento previo al secado.

Los chorizos industriales analizados por Domínguez y col. (1989b) mostraron, en general, valores inferiores a los detectados en los cuatro lotes, aunque presentaron tasas similares de Met y mayores de Tyr a las del lote 1 y de Arg en relación con el lote 3, mientras que el lote 2 mostró valores similares de Ala, Pro y Met. El lote 4 presentó cantidades menores de Arg y semejantes de Tyr y Met.

Los porcentajes de incremento de aminoácidos de los cuatro lotes a lo largo de la maduración fueron bastante más diferentes entre sí de lo que cabía esperar, dado que la masa de los embutidos tenía la misma composición y las condiciones de maduración fueron semejantes. Los aminoácidos de los lotes 3 y 4 fueron los que presentaron un comportamiento más semejante. Este hecho ya se ha venido mencionando en los resultados obtenidos en el análisis de otras fracciones. Como la formulación fue la misma para todos los lotes, la fabricación corrió a cargo de la misma industria y la fermentación y maduración se realizó en la misma cámara bajo iguales condiciones, los diferentes cambios en los distintos aminoácidos hay que atribuirlos a los microorganismos presentes que, como ya se ha dicho, fueron los que se implantaron espontáneamente al no haberse añadido cultivo iniciador. En cualquier caso, tanto la evolución de los aminoácidos como las tasas detectadas pueden

incluirse dentro del amplio intervalo de resultados que se han descrito en investigaciones de esta naturaleza. Por lo tanto, puede decirse que los aminoácidos, en todos los lotes, se comportaron de una forma razonablemente semejante a lo que es habitual en un embutido convencional.

En otro orden de cosas, conviene analizar los resultados obtenidos en el análisis de aminoácidos por HPLC y los alcanzados en la determinación de la fracción soluble en ácido sulfosalicílico al 5%. A fin de cuentas, dicha determinación informa del comportamiento de los aminoácidos libres conjuntamente (Reiter y col., 1969). Al transformar los datos de las tablas III.2 y III.3 en mg de nitrógeno de cada aminoácido/extracto seco y calculando el total de nitrógeno, se obtienen valores similares a los recogidos en la figura III.9. Por ejemplo, en los lotes 3 y 4 se alcanzaron valores iniciales (día 0) del NSS de 141 y 128 mgN/E.S., respectivamente y haciendo la conversión oportuna de las cifras de la tabla III.3 se llega a tasas totales de aminoácidos de 144 y 169 mg N/E.S.. De la misma forma, los valores finales de estos lotes (día 26) para el NSS fueron de 192 y 260 mg N/E.S., frente a 169 y 306 mg N/E.S. que se calculan a partir de la tabla III.3. Teniendo en cuenta que las técnicas para llegar a los datos en uno y otro caso son totalmente diferentes y que el NSS se ha hallado en términos de Gly, puede decirse que la fracción NSS refleja con precisión la evolución de los aminoácidos. Es, pues, un método excelente para determinar la tasa de aminoácidos libres totales en una muestra determinada.

III.1.3.8. AMINAS.

Los resultados obtenidos en la determinación de aminas en los embutidos controles se muestran en la tabla III.4. Los resultados se han expresado en mg de amina por 100g de extracto seco.

Los valores iniciales de las aminas fueron muy similares en todos los controles, excepto los de 2-feniletilamina, que fueron ligeramente superiores en el lote 2 aunque más tarde los valores se igualaron, por lo que hay que considerar la diferencia del primer día como

TABLA III.4. Cambios en el contenido en aminas (mg/100g E.S.) durante la maduración de los embutidos controles.

Lote	Control 1							Control 2							Control 3							Control 4						
	0	2	5	11	19	26	0	3	6	10	14	0	2	5	11	19	26	0	2	5	11	19	26	0	2	5	15	26
Días	0	2	5	11	19	26	0	3	6	10	14	0	2	5	11	19	26	0	2	5	11	19	26	0	2	5	15	26
Triptamina	7,1	4,7	2,3	3,6	4,2	3,2	8,5	9	10,2	12	9,3	5,3	3,7	10,2	6,1	8,9	6,1	5,5	6,1	5,1	4,9	4,9	3,3					
2-Feniletilamina	3,5	Tr	Tr	Tr	1,9	Tr	13,3	Tr	Tr	2,9	2,7	3,2	Tr	3,8	Tr	2,8	1,8	ND	Tr	Tr	Tr	Tr	1,4					
Putrescina + Histamina	1	1,2	2,6	8,4	12,8	18,4	1,8	Tr	6,7	8,2	9,3	Tr	4,7	19,5	27,3	26,7	29,7	ND	25,6	41,4	44,1	44,1	76,9					
Espermidina	2,5	2,2	1,7	1,8	2,4	1,9	2,1	Tr	Tr	Tr	Tr	1,7	1,7	3,3	Tr	2	1,7	Tr	Tr	Tr	2,7	Tr	3,5					
Espermina	12,1	15,1	15,8	13,8	14	17,7	12,9	13,7	10,2	5,7	6,4	11,7	13,9	13,4	13,2	13	13,2	9,8	Tr	11,9	5,2	14,6						
Tiramina	Tr	21,3	25,7	57,4	19,1	23,7	Tr	39	67,4	48	13,4	Tr	5,9	10,8	13,6	8,2	8	ND	8,1	9,3	10,2	14,4						
Cadaverina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	9,7	Tr	22,6	25,5	ND	ND	Tr	28,5	21,3	25,5	ND	ND	ND	ND	ND	ND					

Tr.- trazas; ND.- no detectado

un hecho ocasional.

Los incrementos más claros de las concentraciones a lo largo de la maduración se dieron en la cadaverina en dos lotes y en la putrescina+histamina y tiramina de todos los lotes. En estas dos últimas, inicialmente, no se detectaron o sólo se hallaron indicios o tasas muy bajas. Sin embargo, posteriormente ambas aminas siguieron una evolución distinta. La tasa de putrescina+histamina fue aumentando gradualmente a lo largo de la maduración en los distintos lotes aunque en diferente cuantía, mientras que la tiramina, ausente o en cantidades trazas al principio, alcanzó valores relativamente elevados en las primeras 48-72 horas de maduración para mantenerse después, en términos generales, a niveles no muy diferentes a los hallados en la segunda toma de muestras, aunque se obtuviera ocasionalmente algún valor más elevado.

Otros autores (Dierick y col., 1974; Vandekerckhove, 1977) han detectado también putrescina y cadaverina en otros tipos de embutidos y en tasas elevadas, estando incluso entre las aminas más abundantes. No se conoce, que la autora sepa, cual es el origen de dichas diaminas en los embutidos ni por qué a veces se detectan y otras no. No obstante, sí se sabe con más detalle lo que acontece en otras situaciones donde la flora láctica alcanza, al igual que en los embutidos, valores elevados, como en la carne envasada a vacío (Dainty y col., 1979; DePablo y col., 1989). En carne refrigerada mantenida en aerobiosis se detectan siempre niveles crecientes de putrescina y cadaverina (Nakamura y col., 1979; Edwards y col., 1983), siendo los valores de putrescina mayores que los de cadaverina (Edwards y col., 1983). Estas aminas surgen de las actividades metabólicas de las pseudomonas y enterobacterias (Slemr, 1981). En la carne envasada a vacío la situación es diferente; aunque se observan también cantidades crecientes de ambas enzimas durante el almacenamiento, los valores absolutos son siempre más bajos que en aerobiosis y domina la cadaverina sobre la putrescina (Edwards y col., 1985). Las bacterias lácticas, por una parte, no producen estas diaminas (Dainty y col., 1986; Edwards y col., 1987) y las enterobacterias, por otra, están presentes de forma regular en la carne envasada a vacío aunque a niveles más bajos que las

bacterias lácticas (Dainty y col., 1979; DePablo y col., 1989). Por ello se ha concluido que las enterobacterias son las productoras de las diaminas; la cadaverina se formaría por descarboxilación de la lisina sin la cooperación de otros microorganismos, mientras que la generación de putrescina requeriría la transformación primero de la arginina en ornitina por las bacterias lácticas y después la descarboxilación de la ornitina por las enterobacterias (Edwards y col., 1987).

Ante estos conocimientos, y suponiendo que los lactobacilos de los embutidos y de las carnes a vacío se comporten metabólicamente de forma similar, cabría atribuir la presencia de putrescina y cadaverina a pseudomonas o enterobacterias procedentes de la carne original, pero, si así fuera, se hubieran detectado desde el principio y no se hubiera observado una evolución creciente, dado que ambos tipos de bacterias son muy sensibles a los descensos de la a_w (Troller y Christian, 1978) y, por tanto, no parece probable que puedan estar presentes en etapas avanzadas de la maduración. Los micrococos pueden también descarboxilar los aminoácidos (Turner y Daudin, 1983) pero tampoco parece lógico atribuir la presencia de cadaverina y putrescina a la actividad de las micrococáceas, ya que su tasa declina después de la fase fermentativa (Selgas y col., 1988). En consecuencia, la generación de ambas diaminas, y probablemente la de otras también, puede estar relacionada con otro tipo de flora distinta a la láctica o a la reductora de nitratos y nitritos. En este sentido, conviene recordar que en el ágar manitol-sal (el que habitualmente se utiliza para el recuento de micrococáceas) se ha observado la presencia mayoritaria de bacilos Gram-positivos catalasa positivos (Palumbo y col., 1976; Selgas y col., 1988) a partir de los 15-20 días de maduración. Es posible que estos microorganismos pudieran estar implicados en la formación de las aminas, pero es posible también que éstas pudieran surgir por la actividad de mohos o levaduras, que sí pueden desarrollarse en momentos tardíos de la maduración, sobre todo los mohos, cuya actividad descarboxilante se conoce desde hace tiempo (Sen, 1969) y, de hecho, se ha comprobado que en los quesos en cuya maduración participan estos microorganismos conduce a la formación de aminas no volátiles (Colonna y Adda, 1976).

Por lo que se refiere a la tiramina, su presencia es consecuente con la observación de Edwards y col. (1986), quienes han señalado que los lactobacilos son los responsables de su acumulación en las carnes envasadas a vacío donde dichas bacterias son las dominantes alcanzando tasas del orden de 10^8 u.f.c./cm² (De Pablo y col., 1989), similares a las que se logran en los embutidos. Además, el incremento de la tasa de esta amina, fundamentalmente en la fase fermentativa, coincide con el aumento explosivo de la flora láctica (figuras III.4 y III.5) y, por otra parte, con el descenso que se detectó en la cantidad de tirosina (tablas III.2 y III.3), lo que se ha observado también en otros tipos de embutidos (Dierick y col., 1974; Rice y col., 1975; Santos-Buelga y col., 1986).

El resto de las aminas no mostraron cambios importantes durante la maduración que merezca la pena destacar; sus tasas fueron similares en todos los lotes. Quizá quepa añadir que las bacterias lácticas no pueden producir espermina ni espermidina (Edwards y col., 1987), mientras que las células eucariotas sí (Davis, 1978). De hecho, ya se detectaron en la masa original, siendo la espermina mayoritaria. Después, se observaron ligeras fluctuaciones en las tasas de ambas diaminas. Este mismo comportamiento se ha observado en carne refrigerada (Nakamura y col., 1979), almacenada a vacío (Edwards y col., 1985) y en atmósferas modificadas (Ordóñez y col., 1991).

Respecto a los valores absolutos alcanzados por las aminas y en comparación con los resultados de otros autores cabe decir que se han descrito tasas inferiores a las halladas en este trabajo (Dierick y col., 1974), especialmente para la triptamina, tiramina y 2-feniletilamina.

Vanderkerckhove (1977), en su estudio sobre el contenido de aminas en 26 muestras de embutidos belgas, obtuvo valores entre los que están comprendidos los observados en el presente trabajo. Así, ofreció tasas de putrescina+histamina que oscilaron entre 4,4 y 59,3 mg/100g extracto seco, las cantidades de tiramina se situaron entre 10,2 y 150,6 mg/100g y las de 2-feniletilamina entre valores no detectables y 6,06 mg/100g, siempre teniendo en cuenta que eran productos comercializados. La cadaverina presentó en estos embutidos

valores inferiores a los registrados en el lote 3, lo que en cierto modo apoya el hecho de que dicha diamina no está presente de forma regular en los embutidos. Por otra parte, Koehler y Eitenmiller (1978) detectaron valores similares de tiramina, triptamina y 2-feniletilamina en diversos tipos de embutidos comerciales ("Genoa salami", salami ahumado, "Hard salami", salami "cotto" y "Lebanon bologna").

Las concentraciones de tiramina en embutidos crudos citadas por diversos autores son muy variables. Así, Eitenmiller y col. (1978) observaron cifras máximas de aproximadamente 10 mg/100g de extracto seco en embutidos tipo "cervelat", bastante semejantes a las de los lotes 2 y 3, pero inferiores a las del lote 1. Santos y col. (1985) determinaron tasas de entre 4,6 y 13,7 mg/100g en el salami, 18,7 a 25,4 mg/100g en el salchichón y de 1 a 30 mg/100g en el chorizo, valores comprendidos entre los obtenidos en este trabajo. Santos-Buelga y col. (1986) observaron que el pH ejercía cierta influencia en la producción de tiramina; así, las muestras de chorizo que presentaban un pH más bajo eran las que contenían más tiramina y viceversa, lo que también ha sido observado por Chander y col. (1989), quienes informaron que *Lactobacillus bulgaricus* produce histamina, tiramina y triptamina, siendo las condiciones óptimas a pH 5. En el presente trabajo, por el contrario, los embutidos que presentaron un pH más elevado (lote 1) fueron los que alcanzaron una mayor concentración de esta amina, si bien es cierto que el pH de este lote mostró valores inferiores que los de los chorizos con pH más alto analizados por los autores antes mencionados.

Desde el punto de vista sanitario, las aminas biógenas pueden constituir un problema, principalmente por sus efectos fisiológicos, ya que afectan a la presión sanguínea (la tiramina es hipertensora y la histamina hipotensora), pero también por su acción adversa en pacientes tratados con inhibidores de la monoaminooxidasa (Blackwell y Mabbit, 1965) o en personas susceptibles de padecer migrañas (Sandler y col., 1974).

Las cantidades de aminas capaces de desencadenar estos procesos parecen ser muy variables. Renner (1987) cita como contenidos capaces de ocasionar toxicidad 10-80 mg de

tiramina y 70-1000 mg de histamina. Las cantidades son mucho menores en caso de que se establezca una interacción con medicamentos IMAO. Ponto y col. (1977) estimaron que la cantidad mínima necesaria se situaba, en este caso, en 6 mg de tiramina. En cuanto a la producción de migrañas, Hanington y col. (1970) señalaron que la administración oral de 125 mg de tiramina da lugar a migrañas en pacientes susceptibles, si bien los sujetos normales, utilizados como control, se vieron poco afectados. La 2-feniletilamina, otro agente productor de estos procesos, induce ataques al administrarse en cantidades de 3 mg (Sandler y col., 1974). De cualquier forma, los individuos sanos son capaces de metabolizar las aminas biógenas ingeridas, incluso cuando se consume una cantidad elevada, sin que se observen reacciones fisiológicas adversas (Taylor y col., 1982). En otros productos sometidos a maduración, se han citado cantidades de tiramina superiores a 91 mg/100g y mayores de 40 mg/100g de histamina en queso Cheddar y azul, respectivamente (Renner, 1987). Estos valores son superiores a los detectados en todos los embutidos controles. De acuerdo con las dosis de tiramina mínimas señaladas por Renner (1987) capaces de desencadenar desórdenes en las personas sensibles, la cantidad de embutidos que sería necesario ingerir para producir toxicidad por histamina oscilaría entre 150 y 2000 g según el lote. Respecto a la tiramina, un individuo susceptible tendría que consumir algo más de 200g de embutidos de los lotes 2 y 3 y de 120 g del lote 4 para que se manifestaran los desórdenes. Sin embargo, sólo 67 g del lote 1 serían suficientes para desencadenar toxicidad.

III.2. EMBUTIDOS ELABORADOS CON PRONASA E DE *Streptomyces griseus*.

Con el fin de conocer la potencial utilidad de la pronasa E para acelerar la maduración de los embutidos o potenciar el sabor y aroma de los mismos, se adicionó dicha enzima a dosis de 600 y 6.000 unidades (la unidad enzimática ha quedado definida en II.3.1). Los resultados obtenidos se recogen en el presente apartado.

La elección de la proteinasa pronasa E se hizo en base a la experiencia que ya se tenía en quesos. Esta enzima fue una de las utilizadas por Law y Wigmore (1982) en las investigaciones que realizaron en queso Cheddar.

III.2.1. Evolución de los parámetros fisicoquímicos.

III.2.1.1. EXTRACTO SECO.

La evolución del extracto seco de los embutidos elaborados con pronasa E se recoge en la figura III.11.

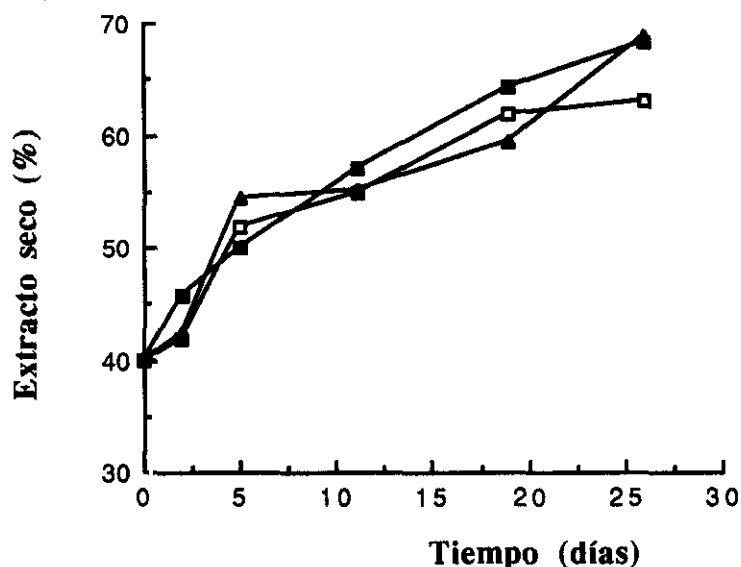


Figura III.11. Evolución del extracto seco de los embutidos elaborados con pronasa E. Control (□); lote con 600 U. (▲); lote con 6000 U. (■).

El valor inicial fue del 40%. Más tarde, las cifras crecieron de forma constante, con ligeras variaciones de unos lotes a otros. Finalmente, los extractos secos de los lotes con pronasa E (68%) fueron algo superiores (un 5%) a los del control (63%). Estas diferencias podrían atribuirse, en un principio, a la mayor proteólisis acaecida en los lotes adicionados con pronasa E (véase III.2.3). Al degradarse las proteínas durante la maduración pueden tener una menor capacidad de retención de agua, lo que puede justificar los mayores valores alcanzados por el extracto seco de ambos lotes. Sin embargo, la degradación fue significativamente más baja en el lote con 600 unidades, siendo los valores finales de nitrógeno soluble en agua (figura III.15) y del nitrógeno no proteico (III.18) más cercanos a los del control. Por ello, no parece probable que esta diferencia en el extracto seco se deba a estas circunstancias. Es posible que sea un hecho ocasional, al menos respecto al lote con 600 U. de pronasa E. Es posible también que en el lote con 6000 unidades se deba, al menos en parte, al fenómeno al que antes se ha hecho referencia; obsérvese en la figura III.11 que las gráficas que representan los extractos secos de este lote y los del control comienzan a separarse a partir de los 7-10 días, cuando los fenómenos proteolíticos más intensos ya se han producido.

A pesar de esta posible influencia de la proteólisis en el contenido en humedad, no cabe duda que dicho parámetro viene regulado fundamentalmente por la humedad relativa que se imponga en la cámara de maduración. Por ello, puede decirse que los resultados del control y los de los lotes adicionados de pronasa E estuvieron dentro de los que podía esperarse. En consecuencia, todas las consideraciones realizadas en el apartado III.1.1.1 son totalmente aplicables a los lotes experimentales elaborados con pronasa E.

III.2.1.2. ACTIVIDAD DE AGUA (a_w).

La figura III.12 muestra la evolución de la actividad de agua en el lote control y en los experimentales.

El valor inicial (masa sin embutir) fue de 0,96 y fue descendiendo, como era de

esperar, a lo largo del proceso madurativo. El control y el lote con 600 U. mostraron valores mayores a los del lote con 6000 U. de pronasa E, empezando a diverger a partir del quinto día de maduración. Al final del proceso, la a_w llegó a un valor de 0,84 en éste, mientras que en el control y en el lote con 600 U. de pronasa E fue de 0,86. Los valores de a_w más reducidos observados en el lote con 6000 U. de pronasa E hay que atribuirlos a la mayor proteolisis del mismo, puesto de manifiesto claramente en la evolución de las fracciones nitrogenadas (véase III.2.3). Al aumentar la concentración de compuestos de bajo peso molecular se produce un incremento de la osmolaridad, ocasionando un descenso de la a_w . No obstante, no debe olvidarse que este lote presentó valores de extracto seco superiores a los otros dos, lo que también contribuye a que la a_w sea más reducida.

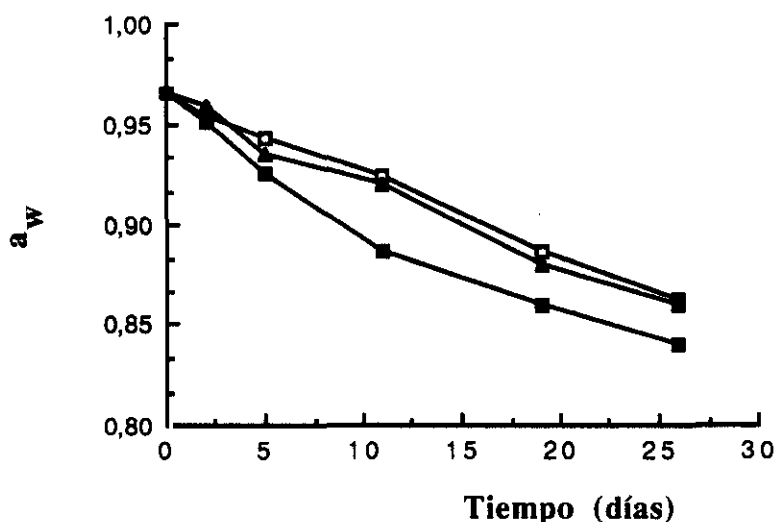


Figura III.12. Evolución de la actividad de agua (a_w) en los embutidos fabricados con pronasa E.
Control (□); lote con 600 U. (▲); lote con 6000 U. (■).

III.2.1.3. EVOLUCION DEL pH.

La evolución del pH de los embutidos a lo largo de la maduración se recoge en la figura III.13.

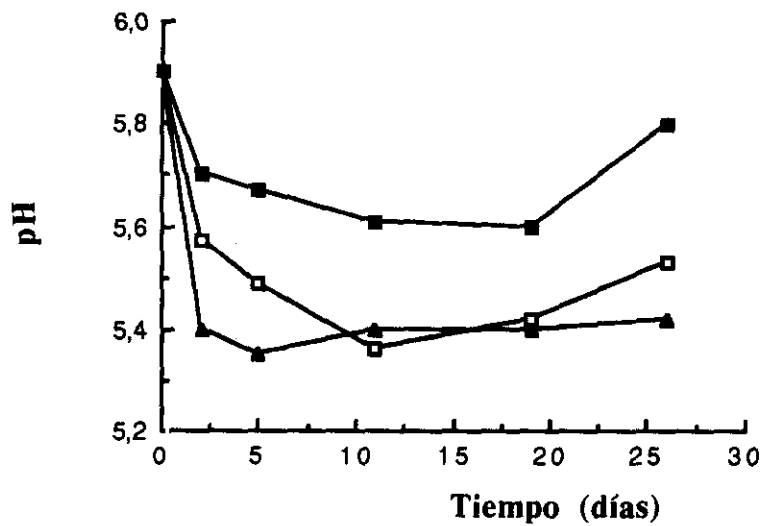


Figura III.13. Evolución del pH en los embutidos fabricados con pronasa E. Control (□); lote con 600 U. (▲); lote con 6000 U. (■).

Los valores más bajos se registraron en el control y en el lote con 600 U. Sin embargo, el que contenía 6000 U. mostró un pH más elevado durante todo el proceso (unas 0,2-0,3 unidades más). Estos resultados se pueden atribuir al acúmulo de compuestos básicos como resultado de la intensa degradación proteica que sufrieron los embutidos de dicho lote.

Por otra parte, y sin tener en cuenta los valores absolutos, la evolución fue bastante parecida en todos los embutidos, con un descenso muy acusado durante la fermentación, otro más suave en las etapas intermedias de la maduración y, al final, un incremento que se observó de forma clara en el control y en el lote pronasa E-6000 U. Ya se ha discutido en el apartado III.1.1.3 diversos aspectos relativos a la evolución del pH descrita por diversos autores en distintos embutidos; puede decirse de forma general que es similar a la observada para el control y el lote con 600 U. de pronasa. Por tanto, el distinto comportamiento de este parámetro en el lote con 6000 U. de pronasa E parece deberse a la actividad de la enzima al ocasionar la liberación de sustancias básicas.

III.2.1.4. CENIZAS.

Respecto al contenido medio de cenizas de los embutidos, véase III.1.1.4.

III.2.2. Evolución de la flora microbiana.

La figura III.14 muestra la evolución de la flora microbiana total, la flora láctica y las micrococáceas de los lotes correspondientes a la experiencia que se describe en el presente apartado.

Puede observarse que las gráficas fueron, en los tres lotes, prácticamente iguales, lo que permite deducir que la adición de pronasa E no afectó en absoluto al crecimiento típico de los microorganismos que adquieren mayor relevancia en la maduración de los embutidos. Aunque, quizás, pueden detectarse ligeras diferencias en los valores absolutos (por ejemplo, en el lote que contenía 600 U. de pronasa, el recuento total y el de la flora láctica fue unas 0,2 unidades logarítmicas superior a los otros dos), no pueden atribuirse a un efecto de la enzima, ya que, por una parte, esas diferencias son totalmente normales y, por otra, los valores obtenidos caen dentro de los descritos por numerosos autores para distintos tipos de embutidos (véanse los comentarios del apartado III.1.2).

III.2.3. Estudio de la proteólisis: evolución de diversas fracciones nitrogenadas.

III.2.3.1. NITROGENO TOTAL.

Respecto al nitrógeno total de los embutidos, véase III.1.3.1.

III.2.3.2. NITROGENO SOLUBLE EN AGUA (NSA).

En la figura III.15 se recogen los resultados obtenidos en la valoración del nitrógeno

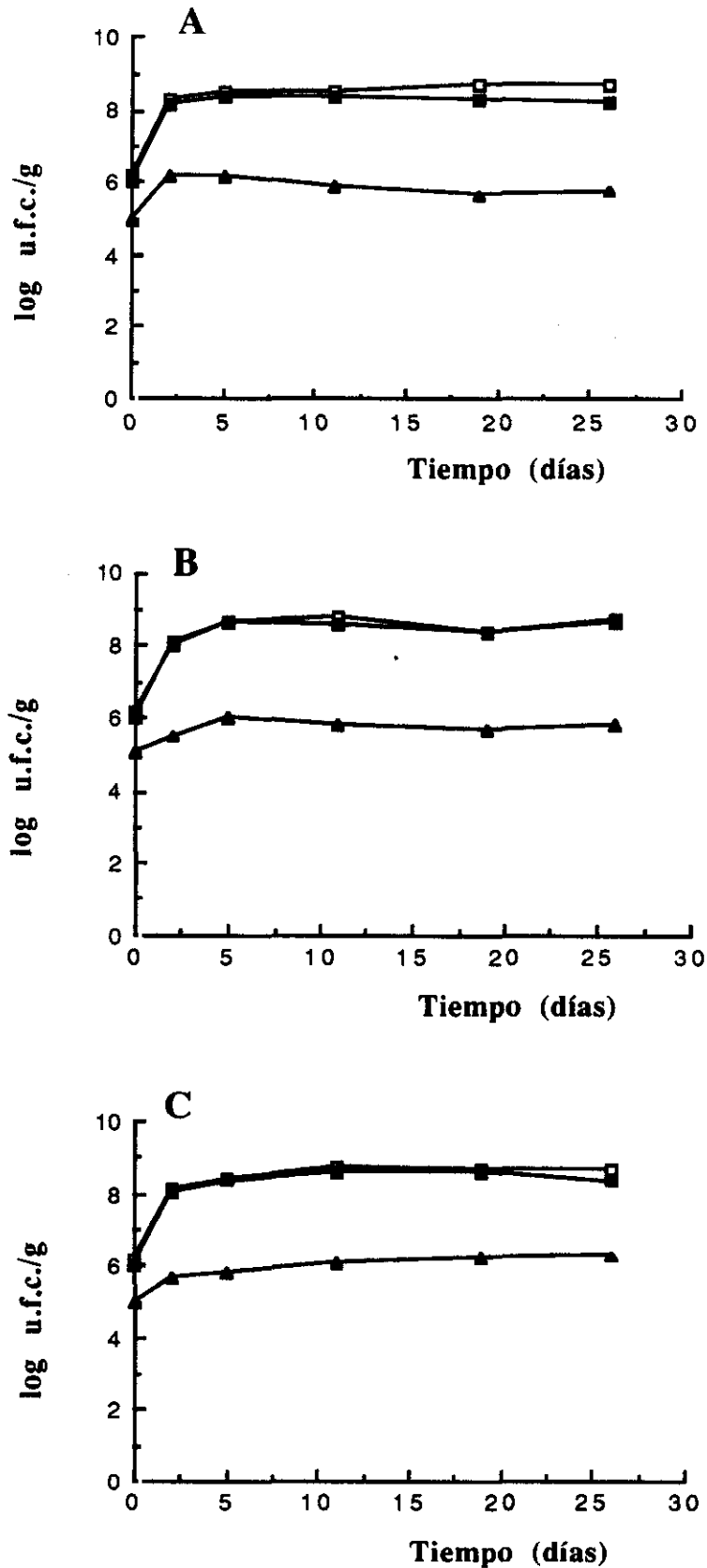


Figura III.14. Evolución de los microorganismos viables totales (□), de la flora láctica (■) y de las micrococáceas (▲) en los embutidos con pronasa E. A: control 1; B: lote con 600 U.; C: lote con 6000 U.

soluble en agua durante la maduración en los lotes adicionados de pronasa E. Dichos resultados se han expresado en gramos de nitrógeno en 100 g de extracto seco.

Los lotes con pronasa presentaron un incremento notable en el NSA respecto al control, aunque la evolución fue similar en todos ellos. El aumento más acusado se produjo en la fermentación, durante la cual se alcanzaron los valores máximos. Posteriormente se detectó un ligero descenso (hacia el quinto día) para mantenerse constante hasta el final del proceso. Ya se ha discutido (III.1.3.2) la evolución del NSA en el lote control y se han observado algunas diferencias en todos los controles que se elaboraron, pero precisamente la evolución mostrada por éste es similar a la descrita por otros autores (Garriga y col., 1988).

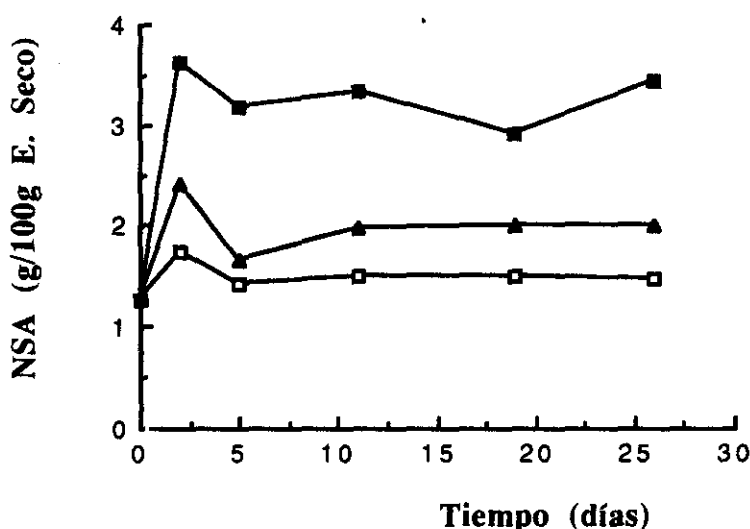


Figura III.15. Efecto de la adición de pronasa E en la fracción de nitrógeno soluble en agua (NSA).
Control (□); lote con 600 U. (▲); lote con 6000 U. (■).

Los porcentajes de incremento al final de la maduración de los lotes con pronasa E respecto al control se muestran en la tabla III.5. En el lote control el NSA final fue de 1,49 gN/100g E.S. y en el lote que se elaboró con 600 U. de pronasa E alcanzó el valor de 2,02 gN/100g E.S., lo que significa un aumento del 35,6%. Al añadir 6000 U. de la enzima se obtuvo un valor del NSA al final de la maduración de 3,43 gN/100g E.S., es decir, un 130%

TABLA III.5. Incremento (%) al final de la maduración respecto al control de las fracciones nitrogenadas estudiadas en los embutidos fabricados con pronasa E.

Proteasa	Unidades	NSA	NNP	NSF	NSS	NBVT
Pronasa E	600	35,6	54,3	67,7	143,7	36,3
Pronasa E	6000	130,2	162,9	148,4	220,6	71,4

NSA: nitrógeno soluble en agua.

NNP: nitrógeno no proteico;

NSF: nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5%.

NSS: nitrógeno soluble en ácido sulfosalicílico al 5 %.

NBVT: nitrógeno básico volátil total.

más que en el control.

Hay que destacar que, en los dos lotes con proteasa, el incremento del NSA fue muy rápido durante la fermentación, observándose después una estabilización de los valores de dicha fracción, lo que se apreció también, como se verá posteriormente, en las fracciones de nitrógeno no proteico y en la soluble en ácido fosfotúngstico al 5% (III.2.3.3 y III.2.3.4). Este fenómeno indica que se produjo una fuerte inhibición, casi detención, del proceso de fragmentación proteica. Dado que la actividad de cualquier enzima depende de diversos factores, entre ellos la temperatura y el pH, la estabilización de los valores de NSA a partir del quinto día se atribuyó en principio, por una parte, al cambio en las condiciones de la cámara de maduración (la temperatura de fermentación se ajustó a 22°C y, concluido este proceso, se redujo a 12°C) y, por otra, a la caída del pH durante la fermentación. Ambos factores, sin duda, influyeron en la actividad de la pronasa E. Para comprobar esta hipótesis se realizó una experiencia para establecer el perfil de actividad de la pronasa E respecto al pH y a la temperatura, de acuerdo con la metodología descrita en II.3.2. Los resultados de ambas experiencias se muestran en las figuras III.16 y III.17. En ambos casos, el dato más importante es el descenso que se produce al pasar de las condiciones de fermentación a las de maduración. Así, a 10 y 15°C la actividad de la pronasa E es, respectivamente, unas 2,3 y 1,7 veces menor que a 25°C a pH 5,0. De la misma forma, a un pH de 5,5 (muy cercano al pH final que se alcanzó en el lote adicionado de 600 U. de pronasa E) la actividad de la enzima es alrededor de 1,3 veces más baja que a pH 5,8 (valor similar al obtenido en el lote con 6000 U.) y unas 1,6 veces menor que a pH 6,0, valor cercano al pH inicial de los embutidos.

Estos resultados indican que, como se suponía, se produjo una disminución de la actividad enzimática una vez concluida la fase fermentativa pero, quizás, no explique totalmente la desaceleración tan intensa de la proteólisis; tienen, pues, que participar, además de los fenómenos antes mencionados, otros que determinen la actividad enzimática. Es posible que entre ellos ocupe un lugar destacado la acumulación de productos resultantes de

la fragmentación proteica, como ocurre con el mecanismo de retroinhibición de los enzimas alostéricos (Lehninger, 1984).

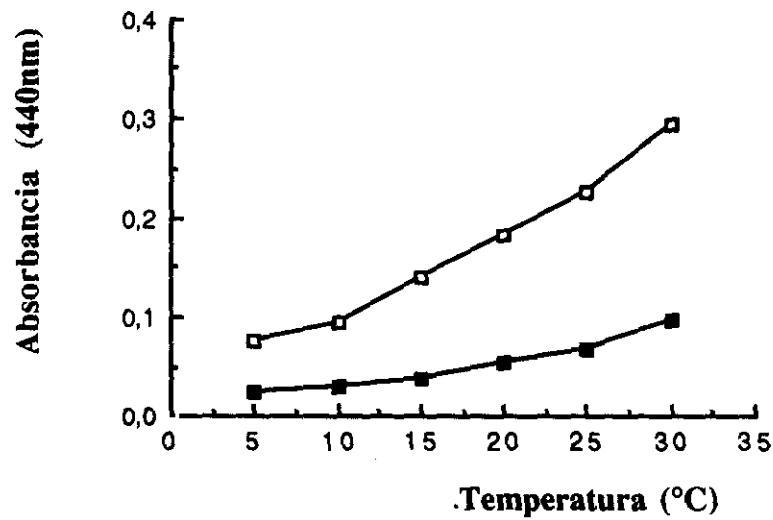


Figura III.16. Efecto de la temperatura en la actividad de la pronasa E a pH 5 (■) y pH 7 (□).

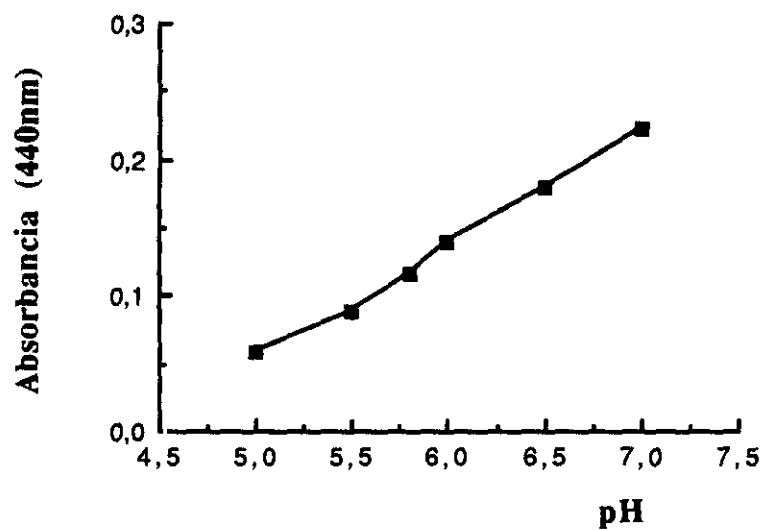


Figura III.17. Efecto del pH en la actividad de la pronasa E.

Estos resultados indican que, como se suponía, se produjo una disminución de la actividad enzimática una vez concluida la fase fermentativa pero, quizás, no explique

totalmente la desaceleración tan intensa de la proteolisis; tienen, pues, que participar, además de los fenómenos antes mencionados, otros que determinen la actividad enzimática. Es posible que entre ellos ocupe un lugar destacado la acumulación de productos resultantes de la fragmentación proteica, como ocurre con el mecanismo de retroinhibición de los enzimas alostéricos (Lehninger, 1984).

III.2.3.3. NITROGENO NO PROTEICO (NNP).

La evolución del nitrógeno no proteico en los lotes de embutidos elaborados con pronasa E se recogen gráficamente en la figura III.18.

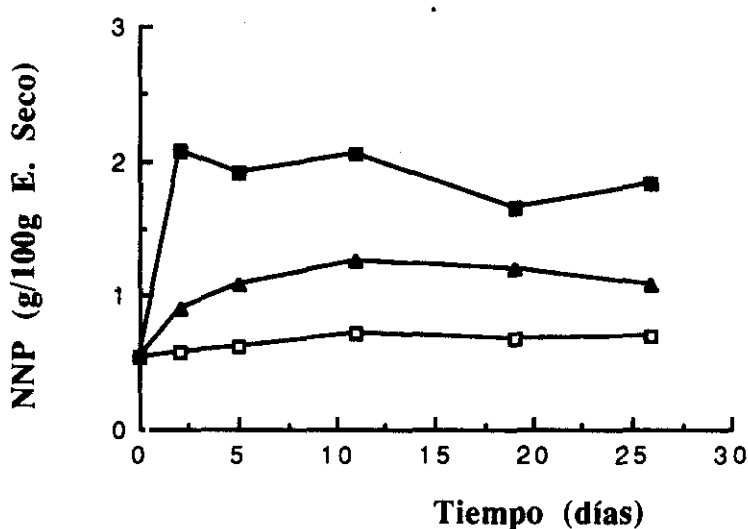


Figura III.18. Efecto de la adición de pronasa E en la fracción de nitrógeno no proteico (NNP)
Control (□); lote con 600 U. (▲); lote con 6000 U. (■).

Los dos lotes con pronasa presentaron una mayor cantidad de NNP que su control, incremento dependiente, además, de la cantidad de enzima añadida. El lote con 600 unidades de pronasa E mostró una evolución bastante paralela a la del control, es decir, un aumento progresivo hasta aproximadamente la mitad de la maduración y después un mantenimiento de los valores hasta el final del proceso. El lote con 6000 U. alcanzó valores aún más elevados y

su evolución fue diferente; se produjo un incremento brusco en la fase fermentativa y un descenso posterior suave que se prolongó hasta el final de la maduración. La evolución fue, por tanto, muy semejante a la observada en el nitrógeno soluble en agua; compárense a tal efecto las gráficas correspondientes a cada una de las fracciones (figuras III.15 y III.18) y obsérvese el paralelismo entre ellas.

Los valores finales de NNP fueron 0,70 gN/100g en el control, 1,08 gN/100g en el lote pronasa E-600 U. y de 1,84 gN/100g en el pronasa E-6000 U., todos ellos referidos a extracto seco.

Los porcentajes de incremento del NNP de estos lotes respecto al control se recogen en la tabla III.5; fueron del 54,3 y 162,9% para los lotes de embutidos con 600 y 6000 U., respectivamente. El lote pronasa E-6000 U. mostró un incremento del 108,6% más que el de 600 U. Se puede decir, pues, que la adición de mayor cantidad de pronasa E incidió de igual forma en el NNP que en el NSA, ya que los porcentajes de aumento de ambas fracciones fueron bastante similares.

Sin embargo, los porcentajes de incremento respecto al control sí fueron algo mayores en el caso del NNP que en el del NSA, por lo que quizá pueda suponerse que la adición de pronasa a los embutidos da lugar a una mayor concentración de péptidos y compuestos de menor peso molecular que los de la fracción de proteínas solubles en agua.

Al igual que ocurrió con el NSA, la proteólisis se produjo sobre todo en la fermentación y se redujo después durante la maduración, lo que podría explicarse de la misma forma: la actividad de las proteasas puede verse inhibida por el cambio de condiciones ambientales en la cámara de maduración y por la bajada de pH en el embutido, unidos a la existencia de un mecanismo de inhibición por productos finales de la degradación proteica. Este tipo de evolución ha sido observada anteriormente (Martin, 1975; Garriga y col., 1988) durante la maduración de salchichones convencionales. Los últimos autores atribuyen este hecho a que parte del nitrógeno pasa a amoníaco, que se difunde en el ambiente hasta la saturación de la cámara de secado. En su caso detectaron un pronunciado aumento del

nitrógeno amoniacal y del crecimiento bacteriano concomitante al descenso del NNP. En las presentes experiencias coincide el mayor desarrollo microbiano con este período, que, a fin de cuentas, es un hecho común en todos los embutidos (véase III.1.2). Sin embargo, la inflexión no aparece en el lote con 600 U. que, no obstante, presentó tasas muy elevadas de nitrógeno básico volátil total, las cuales siguieron aumentando a lo largo de la maduración, lo que no ocurrió en los embutidos analizados por los autores antes mencionados.

III.2.3.4. NITROGENO SOLUBLE EN ACIDO FOSFOTUNGSTICO AL 5% (NSF).

La figura III.19 muestra gráficamente la evolución del nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5% a lo largo de la maduración de los embutidos.

Los lotes con pronasa E presentaron, como era de esperar, un mayor contenido en NSF. En ambos casos la evolución fue similar, experimentando un fuerte incremento durante la fermentación para descender ligeramente una vez finalizada dicha fase y estabilizarse posteriormente, durante el resto del proceso madurativo. Esta evolución coincide, en general, con la observada en las fracciones NSA y NNP. El control, por el contrario, no mostró este rápido incremento durante los primeros días y sólo se produjo un aumento ligero durante la maduración.

Los valores de NSF al final de la maduración fueron, referidos a extracto seco, de 0,31 gN/100g para el control, 0,52 gN/100g en el lote pronasa E-600 U. y 0,77 gN/100g en el pronasa E-6000 U., lo que supuso unos incrementos, respecto al control, de 67,7% y 148,4% para los embutidos adicionados de 600 y 6000 U. de pronasa E (tabla III.4), muy próximos a las observadas para el NNP.

Como el material que permanece soluble en ácido fosfotúngstico al 5% está formado por sustancias nitrogenadas con un peso molecular inferior a aproximadamente 600 d. (Jarret y col., 1982), los resultados anteriores indican que durante la fermentación no sólo se produce la fragmentación primaria de proteínas, sino que igualmente durante esa fase acaece la rotura de enlaces peptídicos de los polipéptidos y péptidos que surgen de dicha

fragmentación, llegando hasta tri- y dipéptidos y aminoácidos. En otras palabras, la adición de pronasa E ocasiona ya en la fase fermentativa una extensa y profunda degradación proteica.

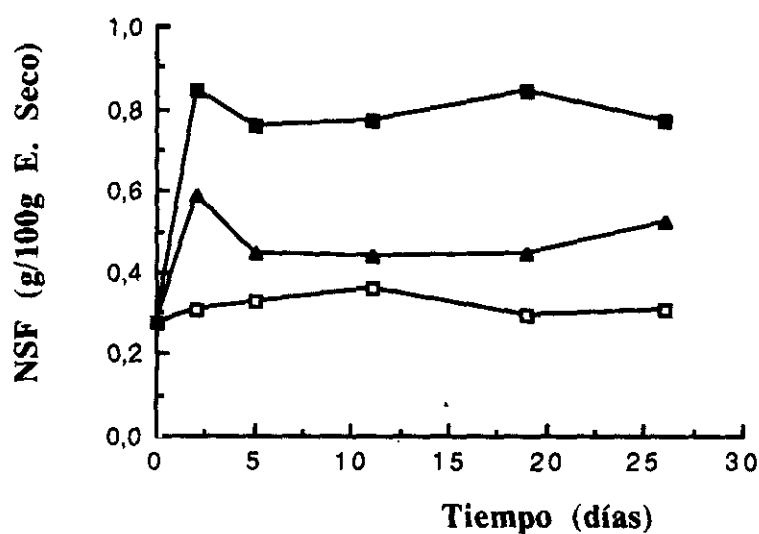


Figura III.19. Efecto de la adición de pronasa E en la fracción de nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5% (NSF).
Control (□); lote con 600 U. (▲); lote con 6000 U. (■).

El aumento del NSF en los embutidos elaborados con pronasa E podría atribuirse a dos efectos. En primer lugar, a que la pronasa E comercial no es un preparado que contenga sólo una proteinasa, si no que es una mezcla de proteasas que incluyen además carboxi- y aminopeptidasas capaces de fragmentar los péptidos incluso a aminoácidos libres; la aparición de sustancias de bajo peso molecular sería, pues, un efecto directo. De forma indirecta, la acción degradativa de la pronasa E proporcionaría gran cantidad de sustrato para las distintas peptidasas tisulares de la carne y también para las de origen microbiano, cuya actividad daría lugar a un aumento de la concentración de compuestos nitrogenados de peso molecular inferior a 600 d. En este sentido conviene recordar la acción colaboradora que se produce entre enzimas exógenos y microbianos en los fenómenos proteolíticos que acaecen durante la maduración del queso. La quimosina, proteinasa mayoritaria del cuajo, aparte de

desestabilizar las caseínas al romper específicamente el enlace peptídico establecido entre la Phe (105) y Ala (106) de la κ -caseína (Dalglish, 1987) ejerce una acción proteolítica secundaria fragmentando fundamentalmente la α_{s-1} -caseína (Fox y Law, 1991), rindiendo péptidos de elevado peso molecular que quedan dispuestos para que después sufran posteriores degradaciones merced a la acción de las bacterias lácticas (Steele y Ünlü, 1992). Es así como la α_{s-1} -caseína sufre una profunda degradación proteica que puede llegar hasta el 80% en quesos de maduración larga (Ordóñez y col., 1978).

III.2.3.5. NITROGENO SOLUBLE EN AÇIDO SULFOSALICILICO AL 5% (NSS).

La representación gráfica de la evolución del nitrógeno soluble en ácido sulfosalicílico al 5% a lo largo de la maduración de los embutidos adicionados de pronasa E se recoge en la figura III.20. Los resultados se han expresado en mg de nitrógeno en 100g de extracto seco.

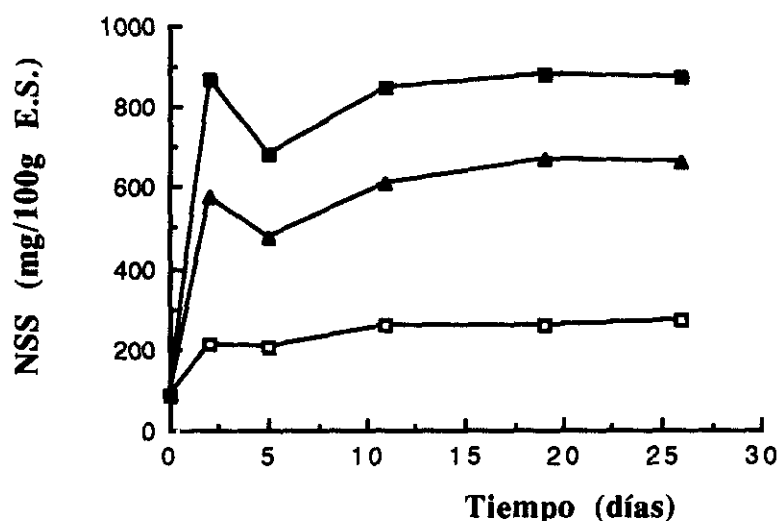


Figura III.20. Evolución del nitrógeno soluble en ácido sulfosalicílico al 5% en los embutidos fabricados con pronasa E. Control (□); lote con 600 U. (▲); lote con 6000 U. (■).

Los lotes con pronasa E presentaron valores muy superiores a los de su control.

Además, se registró en ellos la misma evolución que en las otras fracciones nitrogenadas, es decir, un incremento muy pronunciado hasta el segundo día de maduración, en el que aparece un máximo, después un significativo descenso y, finalmente, un nuevo aumento, más suave, y una estabilización hasta alcanzar los niveles logrados en la fase fermentativa.

Los valores finales fueron de 272, 663 y 872 mgN/100g de extracto seco en los lotes control, pronasa E-600 U. y pronasa E-6000 U., respectivamente. Si se comparan los valores absolutos del NSS con los de NSF (figura III.19), se puede observar que los niveles alcanzados por ambas fracciones nitrogenadas en los lotes adicionados de pronasa E son similares, mientras que en el lote control son algo mayores los de la fracción NSF (unos 300 mgN/100g E.S. de la fracción NSF frente a algo más de 200 mgN/100g E.S. de la fracción NSS). Puede inferirse, pues, que la adición de pronasa E ocasiona una liberación masiva de aminoácidos hasta tal punto que la presencia de di- y tripéptidos de hasta 600 d. queda solapada por los aminoácidos libres.

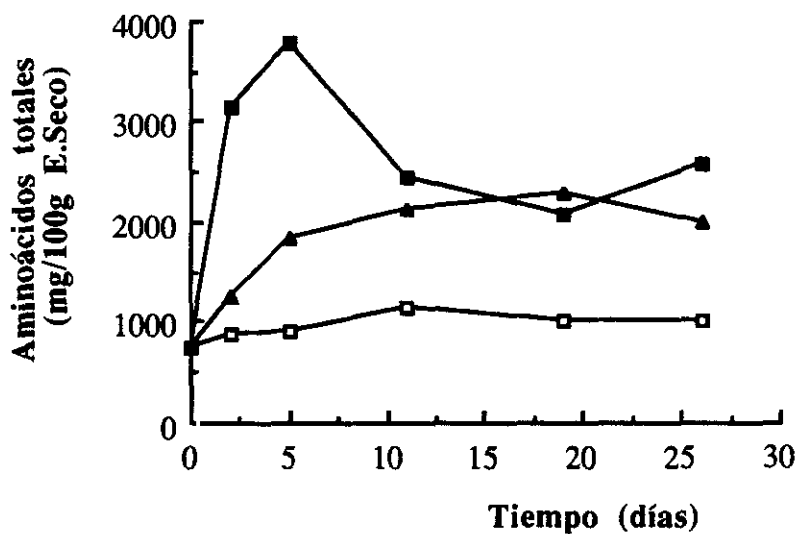


Figura III.21. Evolución de los aminoácidos libres totales en los embutidos elaborados con pronasa E.
Control (□); lote con 600 U. (▲); lote con 6000 U. (■).

Al observar los porcentajes de incremento finales de los lotes con pronasa E respecto al control (tabla III.5), se puede apreciar que son marcadamente superiores a los alcanzados

en las otras fracciones; se podría concluir que la adición de pronasa E ejerce un mayor efecto en las fracciones nitrogenadas inferiores (aminoácidos) que en las superiores, lo que posiblemente se debe, como ya se indicó al analizar la fracción NSF (véase III.2.3.4), a la acción directa e indirecta de la pronasa E. Además, se puede apreciar que el incremento del NSF que se produjo al pasar de 600 a 6000 unidades en los embutidos no indujo, a su vez, un aumento en la cantidad de NSS tan grande como en las otras fracciones antes mencionadas. En este caso, el NSS sólo fue, en el lote con 6000 U., un 76,9% mayor que en los embutidos con 600 U, similar al calculado para la fracción NSF.

III.2.3.6. NITROGENO BASICO VOLATIL TOTAL (NBVT).

La figura III.22 muestra la evolución del nitrógeno básico volátil total durante la maduración de los embutidos elaborados con pronasa E. Los resultados se han expresado en mg de nitrógeno en 100g de extracto seco. No se pudo cuantificar el NBVT presente en la masa de los salchichones previa a la embutición (día 0 del muestreo) debido a que era inferior al umbral de detección de la técnica empleada.

Al igual que en las otras fracciones, los lotes con pronasa E presentaron cantidades superiores de NBVT a las del control. Asimismo, los valores fueron mayores al aumentar la concentración de enzima empleada. En los dos lotes con pronasa E la evolución fue similar, presentando un crecimiento progresivo de las tasas desde el principio hasta el final de la maduración, siendo más pronunciado en la primera mitad de la misma. En las etapas finales se observa una tendencia a la estabilización que quizás refleje, al menos en parte, la disipación de dichas sustancias en el entorno atmosférico.

En la tabla III.5 se recogen los porcentajes de incremento de los lotes con pronasa E respecto al control. El aumento del lote con 6000 U. fue menor que en las otras fracciones y también cuando se calculó respecto al observado en los embutidos con 600 U (un 35%). Hay que tener en cuenta que la enzima no puede desaminar los aminoácidos y, por tanto, por sí misma no es capaz de ocasionar la elevación del NBVT. Probablemente el incremento de esta

fracción en el lote pronasa E-6000 U. sea proporcional al aumento del sustrato disponible hasta cierto nivel, a partir del cual la producción de NBVT se hace más lenta, dado que las reacciones enzimáticas siguen una evolución logarítmica respecto a la concentración de sustrato.

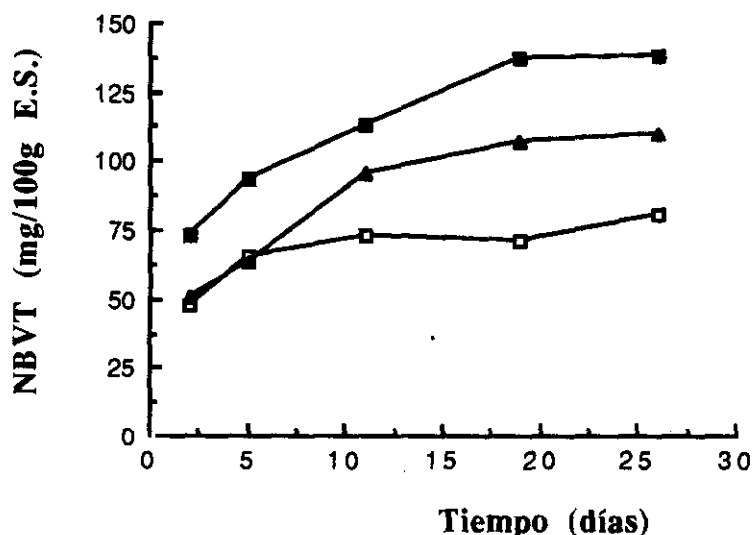


Figura III.22. Evolución del nitrógeno básico volátil total (NBVT) en los embutidos fabricados con pronasa E. Control (□); lote con 600 U. (▲); lote con 6000 U. (■).

III.2.3.7. AMINOACIDOS LIBRES.

Los resultados obtenidos en la determinación de los aminoácidos libres en los embutidos fabricados con pronasa E durante la maduración se recogen en la tabla III.6 Los resultados se han expresado en mg de aminoácido en 100g de extracto seco.

En general, los lotes con pronasa E presentaron una cantidad mayor de aminoácidos que el control durante todo el proceso. También de forma global las cifras fueron superiores en el lote con 6000 U. de pronasa que en el elaborado con 600 U., salvo en determinados aminoácidos (Asp, Glu, Asn+Gly, His, Ala y Val), en los que las tasas fueron parecidas en los dos lotes adicionados de la enzima. Los aminoácidos más abundantes al término del período madurativo fueron, no obstante, prácticamente los mismos aunque en distinto orden.

TABLA III.6. Cambios en el contenido en aminoácidos libres (mg/100g E.S.) en los lotes de embutidos fabricados con pronasa E durante la maduración.

LOTE	Control I						Pronasa (600 U.)						Pronasa (6000 U.)					
	0	2	5	11	19	26	0	2	5	11	19	26	0	2	5	11	19	26
Asp	47	57	77	72	95	83	47	35	58	100	142	113	47	37	159	65	64	90
Glu	72	73	98	90	70	80	72	93	199	205	247	212	72	233	280	163	119	155
Hpr	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Asn + Gly	39	33	30	38	30	30	39	37	71	75	84	76	39	51	37	42	38	59
Ser + Gln	15	16	14	24	22	28	15	34	63	68	75	74	15	100	93	95	84	128
His	190	216	226	292	247	232	190	168	244	288	233	211	190	310	367	316	242	350
Thr	38	81	84	61	58	54	38	77	115	118	129	111	38	172	218	137	119	172
Ala	176	96	92	189	161	147	176	167	155	173	178	138	176	185	173	150	128	173
Pro	39	53	29	125	89	104	39	67	182	206	207	180	39	207	271	260	225	303
Arg	11	59	64	32	23	32	11	118	85	91	84	83	11	135	177	123	110	164
Tyr	12	7	ND	ND	ND	ND	12	40	31	14	Tr	2	12	120	69	15	11	19
Val	18	33	27	34	35	33	18	67	100	111	130	116	18	192	255	151	130	116
Met	22	47	35	24	18	19	22	59	46	77	70	54	22	158	185	106	78	68
Ile	12	24	23	25	25	26	12	52	84	90	96	69	12	261	275	115	97	89
Leu	13	34	33	48	43	48	13	91	132	135	157	132	13	392	488	265	229	198
Phe	11	21	20	26	19	27	11	47	61	74	83	69	11	249	300	136	129	91
Trp	14	14	26	32	21	29	14	8	44	105	161	125	14	54	58	47	45	65
Lys	14	25	30	47	51	54	14	94	162	198	219	227	14	302	379	276	231	344
TOTAL	743	889	908	1159	1007	1026	743	1254	1832	2128	2295	1992	743	3158	3784	2462	2079	2584

ND: no detectado; Tr: trazas.

Los valores encuadrados en el control corresponden a los aminoácidos que más aumentaron a lo largo de la maduración.

Los valores encuadrados en los lotes con enzima son los que más aumentaron, al final de la maduración, respecto al control.

Los valores en negrita corresponden a los aminoácidos predominantes.

Así, en el lote pronasa E-600 U. predominaron Lys, Glu, His, Pro y Ala, mientras que en los embutidos del pronasa E-6000 U. fueron His, Lys, Pro, Leu y Ala. De estos, His, Ala y Pro fueron también los más abundantes en el control. Cabe resaltar que la Lys, en relación con el control, alcanzó valores muy elevados en los dos lotes con pronasa E. Al igual que en los embutidos del control se observó un descenso en la cantidad de Tyr durante el proceso madurativo, a pesar de que en los lotes con pronasa E se produjera un aumento importante en la fase fermentativa.

Los aminoácidos que mayor incremento sufrieron al final de la maduración respecto al control fueron, en el lote pronasa E-600 U., Trp (x4,3), Lys (x4,2), Val (x3,5), Met (x2,8) y Leu (x2,75), mientras que en el pronasa E-6000 U. fueron Lys (x6,4), Arg (x5,1), Ser+Gln (x4,6), Leu (x4,1) y Met (x3,6). Tres de ellos (Lys, Leu y Met) fueron los mismos que en el lote pronasa E-600 U., aunque la Val alcanzó valores realmente elevados en etapas intermedias. Es posible que la gran liberación de Lys en el lote pronasa E-6000 U. explique, junto a los compuestos básicos volátiles, el pH más elevado que se detectó en los embutidos de este lote.

En cinco aminoácidos el aumento fue menor en el lote con más pronasa E que en el que contenía menos enzima (Asp, Glu, Asn+Gly y Trp). Sin embargo, los máximos fueron superiores, por lo que, al parecer, existió una degradación aminoacídica intensa, superior a la velocidad de formación de éstos en la segunda mitad de la maduración. Este fenómeno pudo deberse posiblemente a la distinta actividad microbiana sobre la gran cantidad de aminoácidos liberados, que condujo a procesos de degradación muy tempranos, generándose, entre otros compuestos, nitrógeno básico volátil total que, al alcalinizar el medio, pudo influir en la actividad de la flora.

Del total de aminoácidos libres puede deducirse que, tanto en el lote control como en el de pronasa E-600 U., se produjo un aumento importante de aminoácidos en los cinco primeros días de maduración y después el incremento fue más suave, estabilizándose al final del proceso. Este comportamiento fue similar al observado en la fracción NSS (figura

III.20), aunque en el lote pronasa E-600 U. se observara en esta fracción un ligero descenso una vez concluida la fermentación. Sin embargo, en el lote pronasa E-6000 U. las tasas de aminoácidos libres sufrieron un gran aumento en los cinco primeros días y después disminuyeron, también de forma importante, en los siguientes días hasta el décimo, en que se estabilizaron los valores. Esta evolución es, justamente, la que se observó en la fracción NSS (figura III.20).

En otro orden de cosas, en los lotes con pronasa E, la relación entre la tasa total de aminoácidos en cada muestreo y la de NSS se situó, en la mayoría de los casos, en valores próximos a los que se obtuvieron en los lotes controles (véase III.1.3.7), lo que permite afirmar, de nuevo, que la determinación del NSS refleja muy bien la liberación de aminoácidos durante el proceso madurativo.

Como conclusiones de los datos obtenidos en los aminoácidos libres puede decirse, en términos generales, que la adición de pronasa E a los embutidos conduce a una mayor liberación de Ser+Gln, Pro, Arg, Met, Leu y, sobre todo, Lys. Sin embargo, no afecta o sólo de forma poco relevante, a la liberación de Asp, Asn+Gly, His y Ala. En otros casos, como el de Trp, no puede llegarse a resultados claros.

III.2.3.8. AMINAS.

Los resultados obtenidos en la determinación de aminas en los embutidos fabricados con pronasa E se muestran en la tabla III.7.

Se observa claramente que, excepto para la tiramina, los niveles de aminas obtenidos fueron similares para los tres lotes. Por tanto, la adición de pronasa E no produjo efecto alguno en la generación de aminas y todas las consideraciones recogidas en el apartado III.1.3.8 para los lotes de embutidos controles son válidas para los embutidos fabricados con pronasa E. Se podría argumentar que en el lote al que se le añadió 6000 U. de pronasa E, la 2-feniletilamina alcanzó, durante la maduración, valores ligeramente superiores a los alcanzados tanto por el control como en el lote de 600 U., pero el valor final fue semejante al

TABLA III.7. Cambios en el contenido en aminas (mg/100g E.S.) en los embutidos fabricados con pronasa E.

Lote	Control						Pronasa E (600 U.)						Pronasa E (6.000 U.)					
	0	2	5	11	19	26	0	2	5	11	19	26	0	2	5	11	19	26
Días	0	2	5	11	19	26	0	2	5	11	19	26	0	2	5	11	19	26
Triptamina	7,1	4,7	2,3	3,6	4,2	3,2	7,1	5,4	3,4	5,3	3,3	2,5	7,1	5,2	6,7	7,8	5,6	4,5
2-Feniletilamina	3,5	Tr	Tr	Tr	1,9	Tr	3,5	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	3,5	1,2	ND	3,3	5,1	3,4
Putrescina + Histamina	1	1,2	2,6	8,4	12,8	18,4	1	Tr	6,4	9,2	24,1	15,6	1	Tr	7,1	17,4	20,6	19,9
Espermidina	2,5	2,2	1,7	1,8	2,4	1,9	2,5	2,5	1,8	Tr	1,8	1,6	2,5	2,3	Tr	3,2	Tr	Tr
Espermina	12,1	15,1	15,8	13,8	14	17,7	12,1	20,8	10,3	11,5	15,1	13,4	12,1	11,2	12,8	7,9	11,4	5,2
Tiramina	Tr	21,3	25,7	57,4	19,1	23,7	Tr	51	32,9	73,2	70,7	56	Tr	191,1	287,3	216,4	195,3	208,1
Cadaverina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tr.- trazas; ND.- no detectado

de la masa original, por lo que se ha considerado que tampoco hubo diferencias dignas de ser discutidas. En los tres lotes, sin embargo, se observó que la putrescina+histamina aumentó progresivamente durante la maduración, aunque los valores absolutos no fueron muy grandes. Dado que el comportamiento fue el mismo en los tres lotes, no se puede considerar que dicho fenómeno derivó de la adición de pronasa E, sino que es un hecho habitual en un embutido en maduración. Además, los valores obtenidos deben corresponder a histamina y no a putrescina, ya que las bacterias lácticas, las mayoritarias, no pueden descarboxilar la lisina (Dainty y col., 1986; Edwards y col., 1987). Esta diamina, junto con la cadaverina, se acumulan en la carne refrigerada alterada donde prevalecen las pseudomonas o también en otras situaciones en que existen elevadas tasas de enterobacterias (Slemr, 1981; Dainty y col., 1986). Estos dos tipos de microorganismos están habitualmente ausentes en los embutidos, al descender muy rápidamente su número durante los primeros días de maduración (Lücke, 1984). En III.1.3.8 se discute más extensamente el posible origen de la putrescina+histamina.

La evolución de la tiramina fue similar en los tres lotes; se observó, partiendo de cantidades trazas, un gran aumento en el primer tercio de la maduración para estabilizarse hasta el final del proceso. Esta evolución es totalmente concordante con la de la tirosina, que fue disminuyendo a medida que, por descarboxilación, se va transformando en la amina, lo que, no cabe duda, se debe a la actividad de los lactobacilos, ya que se ha descrito (Edwards y col., 1987) que estas bacterias, al menos las de origen cárnico, pueden descarboxilar este aminoácido.

Las diferencias entre los tres lotes radican en los valores absolutos; los más bajos se lograron en el control y fueron mayores a medida que se añadió más pronasa E, de tal forma que en el lote con 600 U. de pronasa E la tasa de tiramina al final de la maduración fue 2,4 veces superior a la del control y se multiplicó por un factor próximo a 9 en el lote con 6000 U. de la proteinasa. No cabe duda de que la enzima puso a disposición de los lactobacilos una mayor cantidad de tirosina para ser descarboxilada.

Como se ha señalado en el apartado III.1.3.8, las aminas biógenas pueden constituir un problema para la salud. Ya se ha analizado en ese apartado el posible peligro que puede derivar de la presencia de estas aminas en los embutidos convencionales, que se corresponden con los controles en las experiencias que se describen en esta memoria. Como se ha observado, la adición de pronasa E ocasiona, aunque sea indirectamente, una mayor acumulación de tiramina, por lo que su presencia podría ser peligrosa para individuos sensibles. De acuerdo con las cantidades mínimas de tiramina citadas por Renner (1987) capaces de producir toxicidad, ingestas de embutido control superiores a los 67 g contienen la cantidad mínima (10 mg) reseñada por el mencionado autor. Dicha cantidad estaría presente en 26 g de embutido del lote pronasa E-600 U. y en 7 g de los pertenecientes al pronasa E-6000 U. Por lo tanto, la concentración de tiramina ya fue bastante elevada en el control y el aumento de la proteólisis ocasionado por la pronasa E hizo aumentar aún más este contenido. Sin embargo, hay que tener en cuenta que esta toxicidad se presenta sólo en individuos muy susceptibles; en personas sanas el problema presenta mucha menor importancia (Hannington y col., 1970). Si se consideran los datos aportados por Ponto y col. (1977), todos los lotes contendrían cantidades suficientes de tiramina para interaccionar con los medicamentos IMAO. No obstante, en los individuos no especialmente susceptibles estos mínimos de toxicidad son mucho más elevados (Taylor y col., 1982).

Por lo tanto, los embutidos de todos los lotes, incluido el control, presentaron cierto riesgo de toxicidad por tiramina, al menos para algunos individuos, que fue mayor en los que se elaboraron con la proteasa.

III.2.4. Análisis sensorial.

La prueba de diferenciación por el test triangular mostró que los embutidos del lote con 600 unidades de pronasa E no eran significativamente diferentes de los del lote control ($p \geq 0.05$); sin embargo, estos dos lotes sí lo eran ($p < 0,01$) del lote fabricado con 6000

unidades de pronasa E.

Los resultados obtenidos en la prueba preferencial realizada con muestras de embutidos tomadas al final de la maduración se recogen en la tabla III.8. El lote pronasa E-600 U. alcanzó una puntuación superior a la del control, aunque las diferencias no mostraron significancia. La presencia de pronasa E en estos embutidos no modificó la textura, pero mejoró ligeramente tanto la apariencia como el sabor y aroma a juicio del panel de catadores. Estos resultados sugieren que la adición de pronasa E en cantidades próximas a la utilizada en este lote (600 unidades) podrían ser más útiles para mejorar el aroma y sabor de los embutidos o, alternativamente, acortar la maduración.

El lote con 6000 unidades de pronasa E-6000 U. fue calificado, sin embargo, con una puntuación muy baja tanto respecto al control como al lote de 600 U. de la enzima. La causa fue el ablandamiento tan acusado que presentó la masa que, no cabe duda, se debió a la intensa proteólisis que se produjo, la cual acarrió la generación de sustancias nitrogenadas inferiores de mayor solubilidad.

El sabor y aroma fueron calificados con una puntuación muy baja, de 2,9. Obviamente, la sensación de blandura de la masa influyó de forma decisiva en el juicio de los catadores. Realmente, la calificación emitida correspondía al "flavor" y no al sabor y aroma.

Como conclusión final de las experiencias descritas en este apartado puede decirse que la adición de pronasa E puede ser eficaz para potenciar el sabor y aroma de los embutidos o acortar el período madurativo y que las dosis más adecuadas para ello se sitúan en torno a las 600 U. de la enzima, pero concentraciones mucho más elevadas pueden provocar degradaciones intensas de las proteínas que influyen negativamente en la calidad global del producto final.

Tabla III.8. Calidad organoléptica al final de la maduración de los embutidos fabricados con pronasa E.

Lote	Unidades añadidas*	Color y Apariencia	Textura	Sabor y Aroma	Calidad global**
Control	0	7,9a	7,7a	7,8a	7,8a
Pronasa-600	600	8,6a	7,7a	8,3a	8,2a
Pronasa-6000	6000	4,9b	2,8b	2,9b	3,1b

a, b: letras diferentes representan diferencias significativas ($p \leq 0,01$).

* Para la definición de unidad, ver apartado II.3.1

** Calidad global = Color y Apariencia x 0,1 + Textura x 0,25 + Sabor y Aroma x 0,65

III.3. EMBUTIDOS ELABORADOS CON ASPARTIL PROTEINASA DE *ASPERGILLUS ORYZAE*.

Al igual que las experiencias realizadas con pronasa E, el objetivo de las descritas en este apartado era conocer la posible utilización de la aspartil proteinasa de *Aspergillus oryzae* para acortar el período madurativo de los embutidos. Esta enzima es diferente a la anterior, ya que es una proteinasa ácida cuya actividad máxima es a un pH próximo al existente en los embutidos.

La enzima se adicionó a dosis de 800 y 4500 unidades (la unidad enzimática ha quedado definida en II.3.1). Los resultados obtenidos se recogen en el presente apartado.

La elección de dicha enzima se hizo en base a su carácter de proteinasa ácida y dentro de las de este grupo se eligió la aspartil proteinasa de *Aspergillus oryzae* debido a que previamente (Law, 1984a) se había utilizado en estudios similares con el fin de intentar acortar la maduración de los quesos.

La elección de las dosis de enzima se hizo en base a los resultados que ya se tenían sobre la pronasa E. Como la adición de 600 unidades produjo sólo una proteólisis algo superior a la ocurrida en el control se pensó que podría ser más oportuno añadir una dosis algo superior de aspartil proteinasa (800 unidades). De la misma forma, como en el caso de la adición de 10 veces más de pronasa E ocasionó una intensa proteólisis que se traducía en un ablandamiento excesivo de la masa, se eligió una segunda dosis de 4500 U., sólo 5,6 veces superior a la otra.

III.3.1. Evolución de los parámetros fisicoquímicos.

III.3.1.1. EXTRACTO SECO.

La figura III.23 muestra la evolución del extracto seco de los embutidos fabricados con aspartil proteinasa.

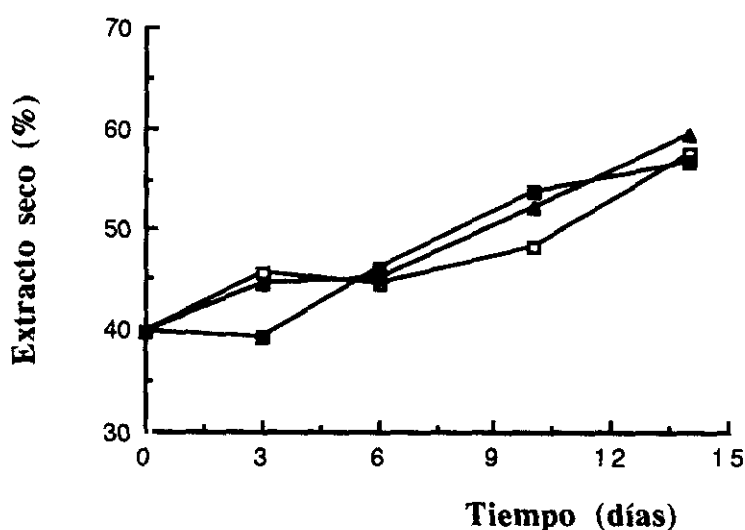


Figura III.23. Evolución del extracto seco en los embutidos elaborados con aspartil proteinasa.
Control (□); lote con 800 U. (▲); lote con 4500 U. (■).

El valor inicial fue de 39,8%, similar al obtenido en los embutidos elaborados con pronasa E. La evolución también fue semejante en todos los lotes, siempre ascendente aunque con ligeras oscilaciones, llegándose, a diferencia de los embutidos con pronasa E (véase III.2.1.1), a valores finales igualmente similares, a pesar de que la proteólisis fue también muy intensa en este caso (véase III.3.3); sin embargo, no parece que afectara tanto a la capacidad de retención de agua como en el caso de la pronasa E.

III.3.1.2. ACTIVIDAD DE AGUA (a_w).

La evolución de la actividad de agua de los embutidos fabricados con aspartil proteinasa se recoge en la figura III.24. Este parámetro, partiendo de un valor inicial de 0,97, fue descendiendo progresivamente, como cabía esperar, durante la maduración.

Al igual que sucedió con el lote fabricado con 6000 U. de pronasa E, los embutidos elaborados con la dosis mayor de aspartil proteinasa (4500 U.) presentaron una a_w más baja

que su control, mostrando una a_w final inferior a 0,88, mientras que en el control y el lote con 800 U. de la enzima no descendió por debajo de 0,90. Al igual que en el caso de la pronasa E, este efecto se ha atribuido al aumento de la cantidad de compuestos de bajo peso molecular resultantes de la proteólisis con una actividad osmótica mayor que las proteínas de donde proceden.

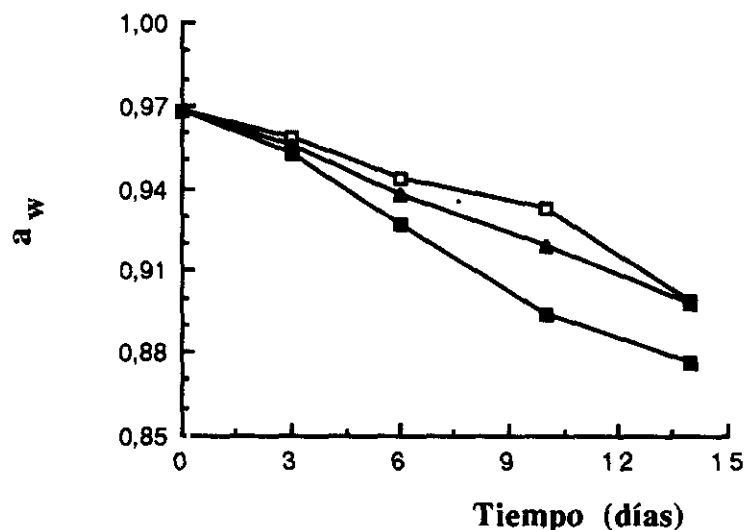


Figura III.24. Evolución de la actividad de agua (a_w) en los embutidos fabricados con aspartil proteinasa.
Control (□); lote con 800 U. (▲); lote con 4500 U. (■).

III.3.1.3. EVOLUCION DEL pH.

La evolución del pH a lo largo de la maduración de los embutidos fabricados con aspartil proteinasa se muestra en la figura III.25. Fue similar en todos los lotes y la típica en esta clase de embutidos (Lücke,1984), presentando el descenso más acusado durante la fase de fermentación, más suave después y al final un ligero incremento. Los valores fueron siempre algo más bajos que los obtenidos en los lotes con pronasa E, incluido el control (véase III.2.1.3), lo que hay que atribuir simplemente a variaciones en las características de la carne empleada en su elaboración o a una actividad de las bacterias lácticas más intensa. Estas

diferencias ya se han discutido ampliamente en el apartado III.1.1.3.

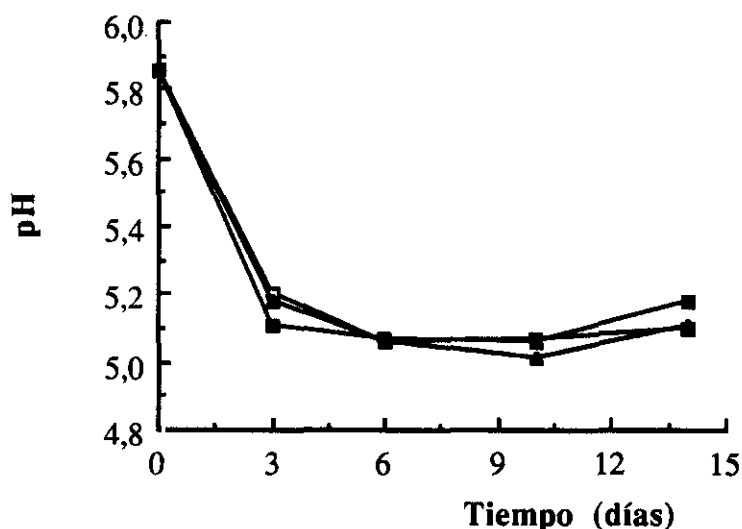


Figura III.25. Evolución del pH de los embutidos fabricados con aspartil proteinasa. Control (□); lote con 800 U. (▲); lote con 4500 U. (■).

También, y a diferencia de lo observado en los embutidos con pronasa E, los valores del pH fueron similares en los lotes con aspartil proteinasa respecto a su control. A pesar del incremento tan intenso de las fracciones nitrogenadas registrado en los lotes con aspartil proteinasa (factor al que se atribuyó el pH más elevado del lote pronasa E-6000 U.), el pH se mantuvo a lo largo de la maduración en los mismos niveles que el control. Næs y col. (1992) describieron un caída marcada del pH en los embutidos preparados con proteinasa de *Lactobacillus paracasei* sp. *paracasei* respecto al control. Estos autores no detectaron, sin embargo y a diferencia de lo observado en el presente trabajo, variaciones en el nitrógeno no proteico, aunque sí una rápida degradación de las proteínas miofibrilares. La existencia de un pH más bajo en los embutidos tratados con enzima que en los controles la atribuyeron a un incremento en la cantidad de oligopéptidos ácidos debido a la acción enzimática.

III.3.1.4. CENIZAS.

Respecto al contenido medio de cenizas de los embutidos, véase III.1.1.4.

III.3.2. Evolución de la flora microbiana.

La figura III.26 muestra gráficamente la evolución de la flora microbiana total, la flora láctica y las micrococáceas de los embutidos fabricados con aspartil proteinasa.

Los recuentos de la flora total y la láctica obtenidos en este control, salvo los valores iniciales relativos a la flora láctica, fueron bastante similares a los observados en el control de los embutidos fabricados con pronasa E (figura III.14). Sin embargo, el recuento de micrococáceas, como se señaló previamente (véase III.2.2), fue más elevado en el control de este lote. El número mayor de micrococáceas se apreció también en los dos lotes con aspartil proteinasa.

En relación a la evolución de la flora y la tasa que alcanzaron los distintos grupos microbianos analizados en el lote control y los embutidos fabricados con la proteinasa, no se ha observado hecho alguno que merezca la pena destacar. Obsérvese en la figura III.26 que las gráficas que muestran su comportamiento son prácticamente iguales, por lo que puede decirse que la adición de aspartil proteinasa, al igual que la de pronasa E, no influyó en absoluto en el crecimiento microbiano.

III.3.3. Estudio de la proteólisis: evolución de diversas fracciones nitrogenadas.

III.3.3.1. NITROGENO TOTAL.

Respecto al contenido de nitrógeno total de los embutidos, véase III.1.3.1.

III.3.3.2. NITROGENO SOLUBLE EN AGUA (NSA).

Los resultados obtenidos (expresados en gramos de nitrógeno en 100 g de extracto seco) en la valoración del nitrógeno soluble en agua a lo largo de la maduración en los embutidos fabricados con aspartil proteinasa se recogen en la figura III.27.

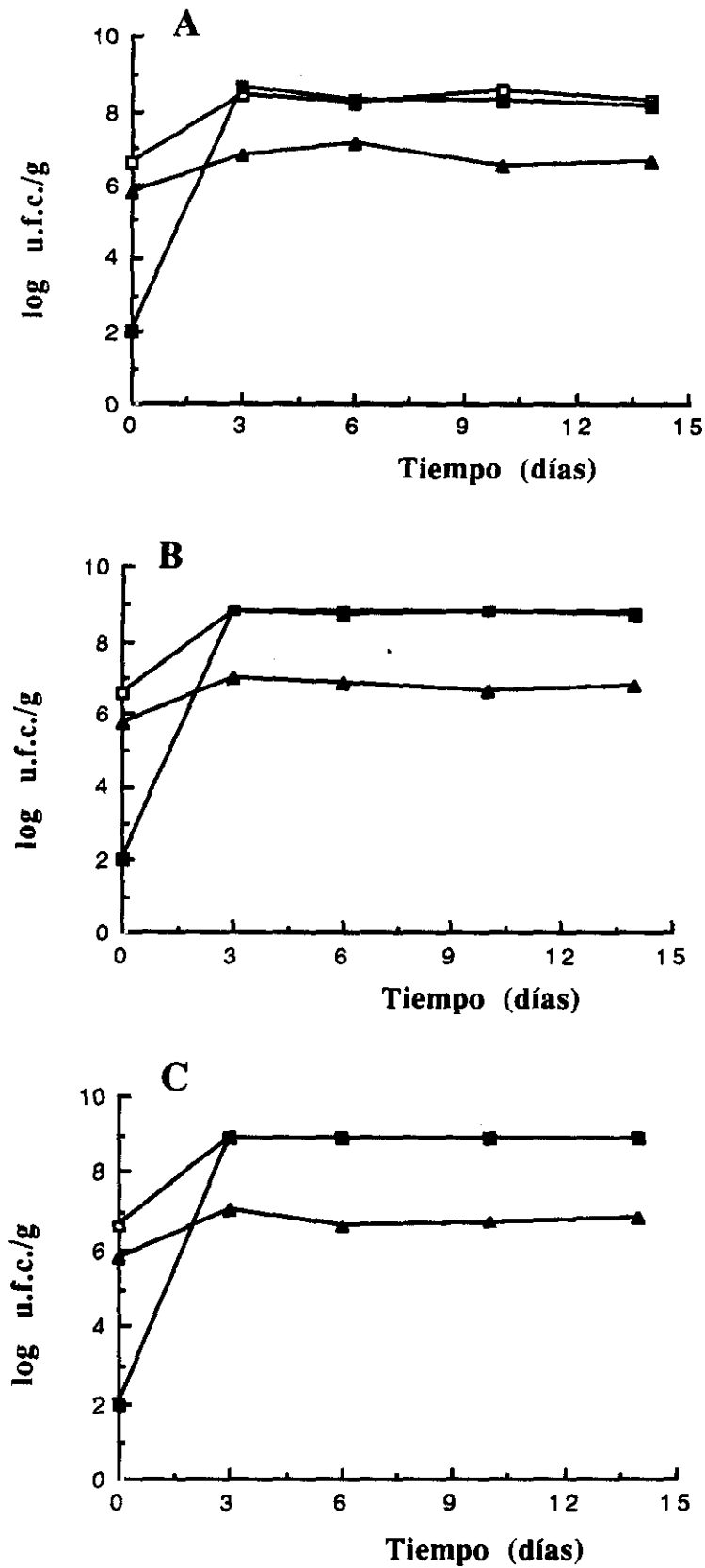


Figura III.26. Evolución de los microorganismos viables totales (□), de la flora láctica (■) y de las micrococáceas (▲) en los embutidos con aspartil proteinasa. A: control 2; B: lote con 800 U.; C: lote con 4500 U.

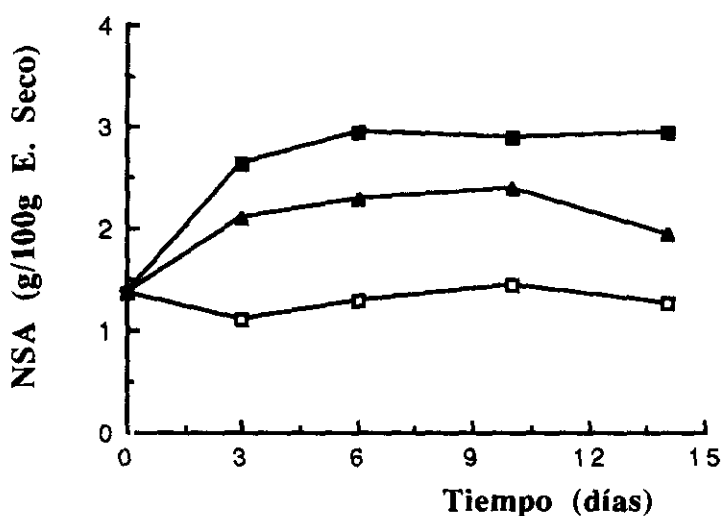


Figura III.27. Efecto de la adición de aspartil proteinasa en la fracción de nitrógeno soluble en agua (NSA).
Control (□); lote con 800 U. (▲); lote con 4500 U. (■).

Los dos lotes con aspartil proteinasa presentaron un incremento notable del NSA respecto al control, que se observó sobre todo en la fase fermentativa y se mantuvo hasta el final de la maduración. Su evolución, además, fue diferente: mientras que el NSA del control aumentó sólo ligeramente a lo largo del proceso, en los embutidos con proteinasa se produjo un aumento intenso en el período inicial, para luego estabilizarse, aunque en el lote aspartil proteinasa-800 U. se observó un ligero descenso al final del período madurativo.

Las tasas de NSA de estos dos lotes se mantuvieron siempre relativamente próximas, si se tiene en cuenta la diferencia de dosis de enzima que se les añadió. Sin embargo, el descenso del lote con 800 unidades al término del proceso hizo que los porcentajes finales de incremento respecto al control estuvieran algo más alejados. En la tabla III.9 se muestran dichos incrementos. En la tabla se han incluido también, con fines comparativos, los incrementos correspondientes a los embutidos que se fabricaron con pronasa E. Puede observarse que los porcentajes de aumento del NSA que ocasionó la aspartil proteinasa fueron sólo ligeramente superiores a los que provocó la pronasa E (téngase en cuenta al hacer

TABLA III.9. Incremento (%) al final de la maduración respecto al control de las fracciones nitrogenadas estudiadas en los embutidos fabricados con aspartil proteinasa.

Proteasa	Unidades	NSA	NNP	NSF	NSS	NBVT
Pronasa E	600	35,6	54,3	67,7	143,7	36,3
Pronasa E	6000	130,2	162,9	148,4	220,6	71,4
Aspartil proteinasa	800	54,8	206,2	136,4	234,9	83,8
Aspartil proteinasa	4500	134,9	306,2	175,7	521,9	151,1

NSA: nitrógeno soluble en agua.

NNP: nitrógeno no proteico;

NSF: nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5%.

NSS: nitrógeno soluble en ácido sulfosalicílico al 5 %.

NBVT: nitrógeno básico volátil total.

la comparación las dosis empleadas en cada caso). Sin embargo, se podrían esperar diferencias más acusadas, ya que la aspartil proteinasa actúa a un pH más favorable que la pronasa E dado el carácter ácido de aquella. Este hecho induce a pensar que pueda ocurrir una fuerte regulación de las enzimas por acumulación de producto, fenómeno al que se ha hecho mención en el apartado III.2.3.2. Las cantidades finales de NSA fueron de 1,26gN/100g en el control, 1,95gN/100g en el lote con 800 unidades de aspartil proteinasa y de 2,96 gN/100g en el lote que contenía 4500 unidades, siempre expresado en términos de extracto seco.

Si se compara la evolución del NSA de estos embutidos con la descrita en los que contenían pronasa E se observa la falta del pico máximo que se apreció en la fase fermentativa. En los embutidos con aspartil proteinasa el aumento fue progresivo, aunque mayor en el primer tercio de la maduración, a lo largo del proceso. En cuanto a los valores absolutos alcanzados, fueron similares para ambas enzimas, a pesar de que la cantidad añadida fuese algo diferente, lo que explica que, aunque la pronasa E actúa de forma óptima en torno a la neutralidad, es estable y capaz de actuar a un pH tan bajo como el que se alcanza en los salchichones (Belitz y Grosch, 1988), lo que ya se había apuntado anteriormente.

III.3.3.3. NITROGENO NO PROTEICO (NNP).

La evolución del nitrógeno no proteico en los lotes de embutidos fabricados con aspartil proteinasa se recogen en la figura III.28. Los resultados se expresaban en gramos de nitrógeno por 100g de extracto seco.

Como era de esperar, los lotes con aspartil proteinasa presentaron un mayor contenido en NNP que el control, que fue además dependiente de la cantidad de enzima añadida. La evolución fue similar a la observada en los lotes con pronasa E (véase III.2.3.3). El mayor aumento se produjo durante la fase de fermentación y, mientras que en el lote aspartil proteinasa-800 U. los valores se mantuvieron después, en el lote con 4500 unidades de la enzima se produjo un descenso hacia el quinto día del proceso, igual que había ocurrido en el lote fabricado con la mayor dosis (6000 U.) de pronasa E. Los valores finales fueron de

0,48, 1,47 y 1,95 gN/100g de extracto seco en el control, en el lote con 800 unidades y en el de 4500 unidades de enzima, respectivamente.

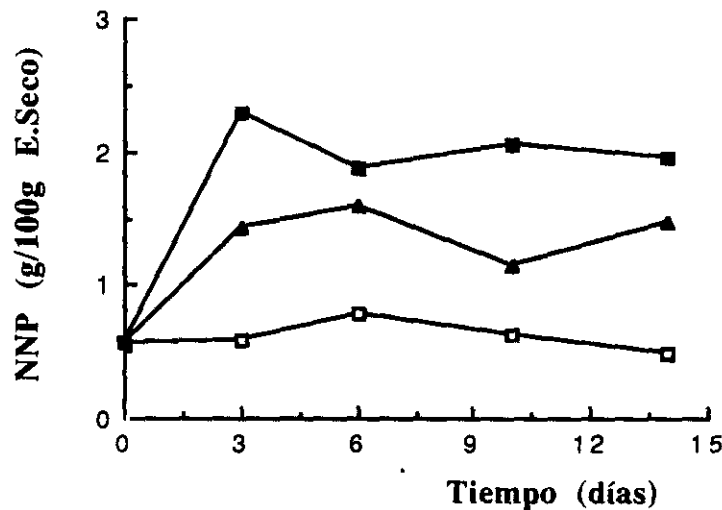


Figura III.28. Efecto de la adición de aspartil proteinasa en la fracción de nitrógeno no proteico (NNP).
Control (□); lote con 800 U. (▲); lote con 4500 U. (■).

Los valores del NNP en los dos lotes con aspartil proteinasa se mantuvieron más próximos entre sí que los correspondientes a los dos adicionados de pronasa E, en los que el aumento de la dosis de enzima incrementó más el NNP. Los porcentajes de incremento finales respecto al control se muestran en la tabla III.9. Se puede observar que el incremento de la proteólisis fue muy superior al obtenido con la adición de pronasa E, lo que indica que, si bien ambas enzimas son igualmente eficaces para provocar la degradación primaria de las proteínas (la fracción NSA puede considerarse parecida en ambos casos), no presentan la misma eficacia para fragmentar los polipéptidos resultantes del ataque primario. La aspartil proteinasa a dosis más bajas (como también en el caso del lote fabricado con 4500 U. frente al de 6000 U. de pronasa E) ocasionó porcentajes de aumento superiores al doble de NNP, es decir, esta enzima produjo a una degradación extensa y profunda de las proteínas musculares.

III.3.3.4. NITROGENO SOLUBLE EN ACIDO FOSFOTUNGSTICO AL 5% (NSF).

La evolución del nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5% a lo largo de la maduración de los embutidos a los que se añadió aspartil proteinasa se muestra en la figura III.29. Los resultados se expresan en gramos de nitrógeno por 100g de extracto seco.

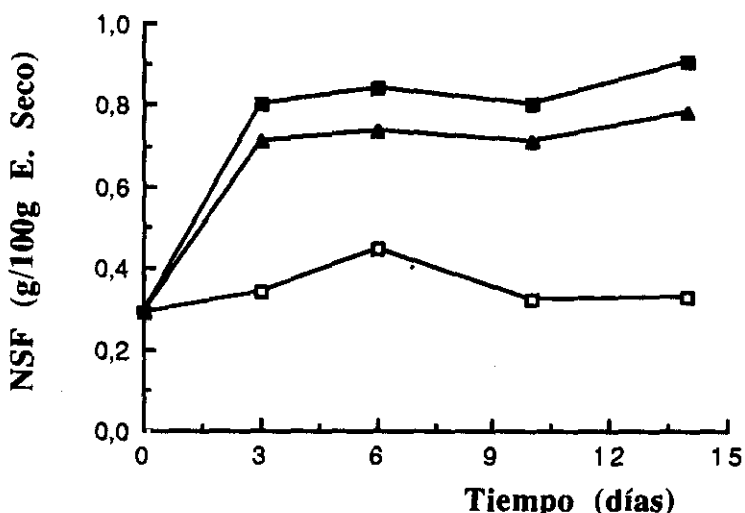


Figura III.29. Efecto de la adición de aspartil proteinasa en la fracción de nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5% (NSF).

Control (□); lote con 800 U. (▲); lote con 4500 U. (■).

Los dos lotes con aspartil proteinasa presentaron tasas de NSF mucho más elevadas que las del control y bastante próximas entre ellas. La evolución fue paralela en ambos lotes. El mayor incremento se produjo, al igual que para el NSA y el NNP, en los tres primeros días de maduración, entrando después los valores en una fase de meseta para finalizar con un ligero aumento adicional al final del proceso. Los valores finales, en términos de extracto seco, fueron de 0,33 gN/100g en el control, 0,78gN/100g en el lote con 800 unidades y 0,91gN/100g en el que contenía 4500 unidades de enzima.

La evolución del NSF de los embutidos con aspartil proteinasa fue diferente a la descrita en los lotes con pronasa E (figura III.19). En esta ocasión no se observó el pico

máximo que se puso de manifiesto con la pronasa E, sino que los valores se estabilizaron tras el incremento inicial.

Como se puede apreciar en la tabla III.9, los incrementos respecto al control fueron intermedios entre los obtenidos para el NSA y el NNP, pero siempre superiores a los que rindió la pronasa E, lo que indica, de nuevo, la eficacia de la aspartil proteinasa para degradar los péptidos que van surgiendo.

El incremento del NSF por la adición de aspartil proteinasa se produjo de forma indirecta, ya que esta enzima no da lugar a la liberación de tri- y dipéptidos ni aminoácidos libres, al no contener carboxi- y aminopeptidasas, como sucedía en el caso de la pronasa E. No obstante, hay que tener en cuenta que en este ataque pueden participar otras enzimas presentes en los embutidos, como dipéptido hidrolasas y carboxi- y aminopeptidasas, tanto de origen tisular (catepsina C) como microbiano.

III.3.3.5. NITROGENO SOLUBLE EN ACIDO SULFOSALICILICO AL 5% (NSS).

La figura III.30 representa la evolución del nitrógeno soluble en ácido sulfosalicílico al 5% a lo largo de la maduración en los embutidos con aspartil proteinasa. Los resultados se expresan en mg de nitrógeno por 100g de extracto seco.

El incremento más intenso de NSS se produjo en la fermentación, igual que ocurrió en las otras fracciones. Sin embargo, el aumento continuó progresivamente durante toda la maduración, siendo más acusado en el lote que contenía la mayor dosis (4500 U.) de enzima, obteniéndose una gráfica global que más bien indica un aumento constante a lo largo de la maduración. En el lote con 800 U. de aspartil proteinasa, tras el incremento inicial, los valores de NSS sólo aumentaron después de una forma suave.

Los valores finales de NSS fueron de 232, 777 y 1443 mgN/100g de extracto seco en los lotes control, con 800 y con 4500 unidades, respectivamente.

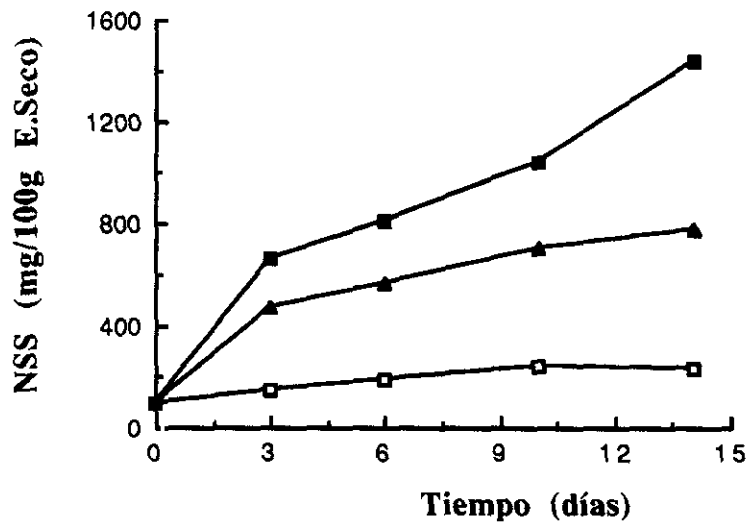


Figura III.30. Efecto de la adición de aspartil proteinasa en la fracción de nitrógeno soluble en ácido sulfosalicílico al 5% (NSS).
Control (□); lote con 800 U. (▲); lote con 4500 U. (■).

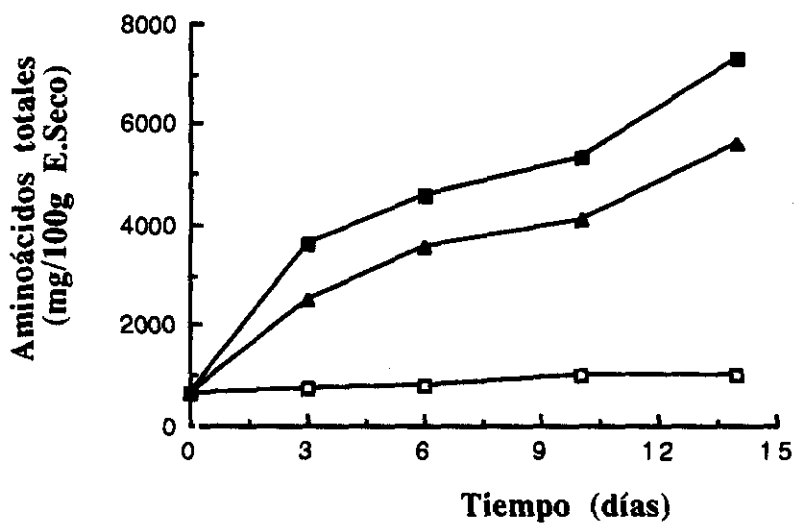


Figura III.31. Efecto de la adición de aspartil proteinasa en la evolución de los aminoácidos libres totales durante la maduración.
Control (□); lote con 800 U. (▲); lote con 4500 U. (■).

Los porcentajes de incremento respecto al control (tabla III.9) fueron mucho mayores que los obtenidos en las otras fracciones nitrogenadas, observándose asimismo una mayor

relación entre las dosis de enzima y las cantidades de NSS liberadas. Al igual que sucedió con la pronasa E, la adición de aspartil proteinasa determinó un mayor incremento de las fracciones más pequeñas (sobre todo aminoácidos). El aumento tan importante del NSS en estos lotes se debe, posiblemente, a la mayor presencia de sustrato disponible (péptidos) para la actuación de las enzimas responsables de la liberación de aminoácidos.

III.3.3.6. NITROGENO BASICO VOLATIL TOTAL (NBVT).

La figura III.32 muestra la evolución del nitrógeno básico volátil total durante el período madurativo de los embutidos fabricados con aspartil proteinasa. Los resultados se expresan en mg de nitrógeno en 100g de extracto seco.

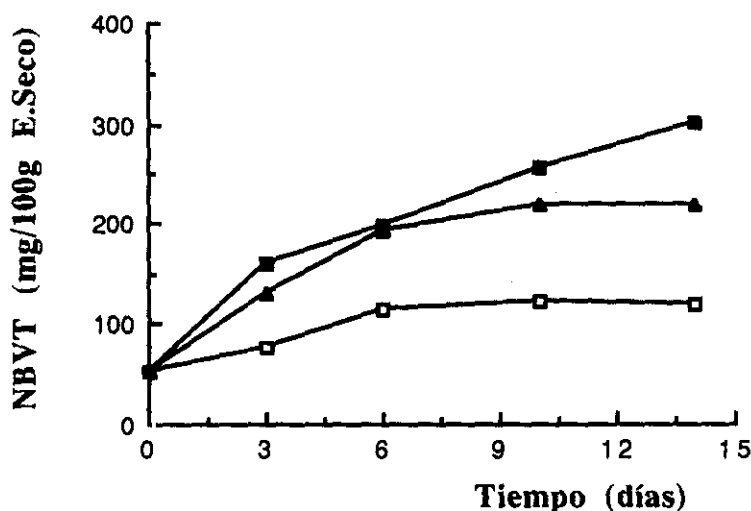


Figura III.32. Evolución del nitrógeno básico volátil total (NBVT) en los embutidos fabricados con aspartil proteinasa.
Control (□); lote con 800 U. (▲); lote con 4500 U. (■).

De igual modo que ocurrió con todas las demás fracciones nitrogenadas, los lotes con aspartil proteinasa contenían cantidades superiores de NBVT a las del control. Sin embargo, no se observaron diferencias importantes en relación con la cantidad de enzima añadida; sólo al final de la maduración las gráficas de ambos lotes divergieron claramente. Los valores

finales de NBVT fueron de 119, 220 y 300 mg/100g de extracto seco en los lotes control, con 800 y con 4500 unidades de aspartil proteinasa, respectivamente.

La evolución del NBVT fue semejante a la descrita en los lotes con pronasa E, considerando un período de maduración equivalente. No obstante, las tasas fueron en los embutidos con aspartil proteinasa mucho mayores a los observados en los lotes fabricados con pronasa E.

Los porcentajes de incremento respecto al control (tabla III.9) fueron mucho más bajos que los calculados para la fracción de NSS que es, por otra parte, el principal sustrato a partir del cual se forma el NBVT por desaminación. Esta situación también se presentó en los lotes con pronasa E (tabla III.5), por lo que puede decirse que, en ambos casos, la formación de aminoácidos fue más intensa que su degradación.

III.3.3.7. AMINOACIDOS LIBRES.

La tabla III.10 muestra los resultados obtenidos en la determinación de los aminoácidos libres durante el período madurativo de los embutidos fabricados con aspartil proteinasa. Los resultados se expresan en mg de aminoácido en 100g de extracto seco.

En los dos lotes con aspartil proteinasa y para todos los aminoácidos se observó un aumento continuado de sus tasas desde el principio hasta el final de la maduración. Si se compara con el lote control, se puede ver que en éste sólo 6 aminoácidos mostraron la concentración máxima al final del proceso, mientras que en los lotes con la proteinasa fue una norma general. La formación de aminoácidos libres fue, por tanto, más intensa que su degradación, existiendo, en cambio, mayor degradación de casi todos ellos en el control.

Como era de esperar, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la valoración de las otras fracciones nitrogenadas, los valores absolutos de todos los aminoácidos a lo largo de la maduración en los lotes con aspartil proteinasa fueron superiores a las del control y también más elevados en el lote con 4500 unidades de enzima que en el que contenía 800 unidades. Los aminoácidos más abundantes al final de la maduración fueron casi los mismos

Tabla III.10. Cambios en el contenido en aminoácidos libres (mg/100g E.S.) en los embutidos fabricados con aspartil proteinasa durante la maduración.

LOTE	Control 2														
	Aspartil proteinasa (800 U.)						Aspartil proteinasa (4500 U.)								
Días	0	3	6	10	14	0	3	6	10	14	0	3	6	10	14
Asp	39	7	13	23	17	39	53	114	128	129	39	72	155	178	260
Glu	59	96	105	138	141	59	228	377	400	588	59	316	449	524	743
Hpr	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Asn + Gly	44	47	42	46	50	44	104	128	148	193	44	135	167	190	243
Ser + Gln	10	14	15	18	17	10	152	224	237	323	10	240	294	338	451
Arg	Tr	11	12	21	18	Tr	73	107	115	172	Tr	108	122	144	207
His + Thr	242	252	254	295	299	242	323	374	423	594	242	371	479	476	589
Ala	69	50	55	64	62	69	176	195	253	343	69	210	284	295	699
Pro	11	24	27	31	35	11	84	102	110	148	11	113	129	133	163
Cys	33	10	39	24	23	33	13	Tr	27	43	33	Tr	Tr	36	49
Tyr	25	26	24	16	16	25	35	29	35	43	25	39	43	42	61
Val	27	48	49	56	55	27	154	215	266	353	27	193	268	307	405
Met	8	11	13	22	20	8	92	133	154	202	8	162	189	224	302
Ile	16	22	29	22	20	16	119	177	200	275	16	170	206	263	334
Leu	18	39	46	68	65	18	270	399	464	622	18	432	509	619	812
Phe	11	16	29	42	59	11	151	233	281	379	11	276	379	369	430
Trp	Tr	33	49	66	59	Tr	189	323	421	543	Tr	282	373	485	690
Lys	18	27	23	56	45	18	291	446	469	645	18	499	547	702	876
TOTAL	630	733	824	1008	1001	630	2507	3576	4131	5595	630	3618	4593	5325	7314

ND: no detectado; Tr: trazas.

Los valores encuadrados en el control corresponden a los aminoácidos que más se incrementaron a lo largo de la maduración.

Los valores en negrita corresponden a los aminoácidos predominantes.

en ambos lotes; en el de 800 U. de enzima los cinco mayoritarios fueron Lys, Leu, Glu, His+Thr y Trp y en el de 4500 U., Lys, Leu, Glu, Ala y Trp. Los aminoácidos que predominaron en el control fueron His+Thr, Glu, Leu, Ala, Phe y Trp. Si se comparan con los que más abundaron en los lotes con la proteinasa se observa que en éstos aparece la Lys en primer lugar, aminoácido no presente entre los seis más abundantes del control. Al mismo tiempo, His+Thr, situados en el lote control en primer lugar pasan a ocupar posiciones más alejadas en los lotes con aspartil proteinasa. El predominio de la lisina también ocurrió en los lotes con pronasa E (véase III.2.3.7). Parece que la adición de enzimas incide de alguna forma en la liberación masiva de este aminoácido.

En los lotes elaborados con pronasa E (véase III.2.3.7) se observó que el aumento de los aminoácidos no era tan generalizado como en los lotes elaborados con aspartil proteinasa. En este caso, no se produjo disminución de ningún aminoácido, ni siquiera de tirosina, como ocurrió en lotes con pronasa E en los que dicho aminoácido se transformó en tiramina (véase III.2.3.8). No obstante, también en los lotes con aspartil proteinasa se produjo la descarboxilación de este aminoácido, aunque con menor intensidad, como lo demuestra el análisis de las aminas (tabla III.11).

Quizás convenga también resaltar que la liberación masiva de Asp y Glu en los lotes con aspartil proteinasa contrastó con el escaso o nulo efecto que ocasionó la adición de pronasa E (tabla III.6). Es posible que en este hecho radique, al menos en parte, la diferencia en los valores del pH que se obtuvieron en el lote con 6000 U. de pronasa E y los de aspartil proteinasa que fueron mayores en el primer caso.

Los aminoácidos que mostraron un mayor incremento (entre paréntesis se anota los factores de incremento para el lote de 800 y 4500 U., respectivamente) respecto al control al final de la maduración fueron los mismos en los dos lotes de salchichones a los que se les añadió la enzima y en el mismo orden: Ser+Gln (x19, x26), Lys (x14, x19) e Ile (x14, x17). Después se situaron Met (x10) y Leu (x10) en el lote con 800 U. de la proteinasa, y Asp (x15) y Met (x15) en el caso del lote con 4500 U.

En la figura III.31 se ha representado, además de la evolución de la fracción NSS (en términos de mgN/100g E.S.), los cambios en las tasas totales de los aminoácidos libres (mg/100g E.S.). Aunque están expresados en términos diferentes, puede comprobarse el paralelismo entre las gráficas correspondientes. Además, la relación de cada par de valores del muestreo correspondiente se mantuvo entre 5-7, que permite transformar el peso de aminoácido en el de nitrógeno del aminoácido correspondiente, que es como se obtiene al determinar el nitrógeno soluble en 5% de ácido sulfosalicílico (Reiter y col., 1969).

III.3.3.8. AMINAS.

La tabla III.11 muestra los resultados obtenidos en la determinación de las aminas en los embutidos fabricados con aspartil proteínasa.

El análisis de la tabla y su comparación con la correspondiente a las aminas de los lotes de embutidos elaborados con pronasa E, permite deducir que la situación es muy similar, es decir, no se observaron diferencias entre los tres lotes para cada una de las aminas, excepto en la tiramina. Asimismo, se observó un aumento progresivo de la putrescina+histamina. En consecuencia, todas las consideraciones realizadas para las aminas de los lotes de embutidos fabricados con pronasa E (véase III.2.3.8) son totalmente aplicables a los elaborados con aspartil proteínasa.

En cuanto a la tiramina, la evolución de la misma durante la maduración fue, igualmente, similar a la de los lotes fabricados con pronasa E, aunque los valores absolutos en este caso fueron mucho más bajos que en los embutidos con pronasa E (compárense las tablas III.7 y III.11). Por ejemplo, al final de la maduración las tasas de tiramina fueron, en los lotes fabricados con aspartil proteínasa, entre 4 y 7 veces más bajas que los alcanzados en los lotes con pronasa E. Esta situación hay que considerarla totalmente independiente de las enzimas añadidas y puede atribuirse a la presencia de una flora láctica con actividad tirosina descarboxilasa diferente. Recuérdese que se han observado diversos efectos diferentes en los embutidos controles, que se han atribuido a la implantación de una flora láctica distinta

TABLA III.11. Cambios en el contenido en aminas (mg/100g E.S.) en los embutidos fabricados con aspartil proteinasa.

Lote	Control					Aspartil-prot.(800 U.)					Aspartil-prot.(4.500 U.)				
	0	3	6	10	14	0	3	6	10	14	0	3	6	10	14
Triptamina	8,5	8	6,5	4,7	5,3	8,5	9	10,2	12	9,3	8,5	14,0	12,1	13,8	17,6
2-Feniletilamina	13,3	3,9	Tr	Tr	Tr	13,3	Tr	Tr	2,9	2,7	13,3	3,3	2	2,8	4,6
Putrescina + Histamina	1,8	1,7	4,9	6	6,1	1,8	Tr	6,7	8,2	9,3	1,8	4,4	5,3	8,5	12,9
Espermidina	2,1	1,9	2,9	1,4	1,6	2,1	Tr	Tr	Tr	Tr	2,1	3,3	Tr	3,4	Tr
Espermina	12,9	12,3	17	12,7	9,4	12,9	13,7	10,2	5,7	6,4	12,9	11,6	12,1	10,3	7,5
Tiramina	Tr	6,3	9,2	9,1	7,1	Tr	39	67,4	48	13,4	Tr	54,9	74,7	55,5	27,8
Cadaverina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	9,7	Tr	22,6	25,5	ND	17,5	Tr	15,9	46,9

Tr.- trazas; ND.- no detectado

derivada de la no adición de cultivos iniciadores en los embutidos utilizados en las experiencias que se describen en la presente memoria.

Como la acumulación de tiramina es un fenómeno ajeno a la actividad de las enzimas proteolíticas y depende de los lactobacilos, cabe presumir que en este lote de embutido las especies, o cepas, de dichos microorganismos no poseían tanta actividad descarboxilante de la tirosina. De hecho, Edwards y col. (1987) observaron diferencias entre las numerosas cepas que estudiaron. Así, *Lactobacillus divergens* y *Lactobacillus carnis*, actualmente incluidos en el género *Carnobacterium* como *C. divergens* y *C. piscicola*, respectivamente (Collins y col., 1987), produce una cantidad relevante de tiramina y de las 10 cepas de lactobacilos acidúricos (Shaw y Harding, 1984) que ensayaron, sólo una genera cantidades apreciables de tiramina, otra mucho más bajas y el resto no ocasionan la formación de tiramina. Es necesario aclarar que dichas experiencias se han realizado en carne obtenida asépticamente y la disposición de tirosina, no cabe duda, es más baja que en el caso de los embutidos. No obstante, es un estudio muy ilustrativo para deducir las diferencias que pueden existir entre cepas.

Desde el punto de vista sanitario, y según las cantidades que pueden ocasionar toxicidad citadas por Renner (1987), ninguno de los lotes de embutidos fabricados con aspartil proteinasa podrían ocasionar perjuicios a la salud por su contenido en histamina. Sin embargo, los contenidos en tiramina sí podrían causar problemas; las cantidades de este producto que se necesitarían para ingerir los 10 mg que el citado autor considera como umbrales de toxicidad serían 244 g de embutidos control, 126 g del lote con 800 unidades de aspartil proteinasa y sólo 63 g del que contenía 4500 unidades de la enzima. Si se consideran como consumo normal de embutido porciones de entre 50 y 100 g, el control y el lote con 800 U. no provocarían perjuicios ni en los individuos más susceptibles. En cambio, el consumo de embutidos del lote elaborado con 4500 unidades de aspartil proteinasa sí que presenta algún riesgo, ya que supera los 6 mg señalados por Ponto y col. (1977), aunque solamente en individuos susceptibles. La feniletilamina tampoco estuvo presente en

concentraciones capaces de desencadenar migrañas (3mg; Sandler y col., 1974). Por lo tanto, desde el punto de vista sanitario, la adición de aspartil proteinasa en cantidades no muy elevadas no incrementa el riesgo de intoxicación al menos en individuos sanos.

III.3.4. Análisis sensorial.

La prueba de diferenciación triangular mostró que los dos lotes de embutido a los que se les había añadido aspartil proteinasa fueron significativamente diferentes del control ($p < 0,01$).

La tabla III.12 recoge las puntuaciones obtenidas por los embutidos en la prueba preferencial. Las puntuaciones tan bajas de los lotes con proteinasa se debieron principalmente al excesivo ablandamiento que originó su actividad sobre las proteínas de la carne y de aquí las diferencias significativas que se observaron en la prueba triangular. Ya se ha comentado anteriormente que la enzima ocasiona una fuerte degradación proteica, tanto en extensión como en profundidad. Este ablandamiento fue la razón en que la autora se basó para suspender el muestreo tras 14 días de maduración, ya que se consideró que, aunque el proceso fuera más prolongado, nunca adquirirían los embutidos su dureza característica.

A pesar del excesivo ablandamiento que, sin duda, influyó negativamente en el dictamen de los catadores, la puntuación del sabor y aroma fue más elevada que la alcanzada por las otras propiedades analizadas y mayor en el lote con más proteinasa. También fue superior a la conseguida por el lote con 6000 U. de pronasa E (tabla III.8), el cual, no obstante, mostró una valoración bastante similar en las otras características. Parece, pues, que la adición de aspartil proteinasa no induce un sabor y aroma desagradables a juicio de los catadores, si se compara con los embutidos que contenían una cantidad elevada de pronasa E o con las otras características sensoriales evaluadas. Hay que tener en cuenta que, además, dicha valoración se realizó en relación a un embutido crudo madurado; es posible que su evaluación sensorial en un producto cárnico de textura diferente obtuviera aún mejores

Tabla III.12 Calidad organoléptica al final de la maduración de los embutidos fabricados con aspartil proteinasa.

Lote	Unidades añadidas*	Color y Apariencia	Textura	Sabor y Aroma	Calidad global**
Control	0	7,4a	6,2a	7,8a	7,4a
Aspartil-800	800	4,0b	3,2b	5,9b	5,1b
Aspartil-4500	4500	4,0b	3,0b	6,2b	5,2b

a, b: letras diferentes representan diferencias significativas ($p \leq 0,01$).

* Para la definición de unidad, ver apartado II.3.1

** Calidad global = Color y Apariencia x 0,1 + Textura x 0,25 + Sabor y Aroma x 0,65

resultados. Se concluyó, por tanto, que a bajas dosis esta enzima podría ser útil para acortar el período madurativo de los embutidos o, alternativamente, potenciar el sabor.

III.4. EMBUTIDOS CON PAPAÍNA DE *Carica papaya*.

El objetivo de las experiencias descritas en este apartado era, de la misma forma que con la pronasa E y la aspartil proteinasa, comprobar la posible utilidad de la papaína en la aceleración de la maduración de los embutidos o en la potenciación de su sabor y aroma. Esta enzima es una tiol proteinasa cuya actividad óptima se encuentra en valores de pH cercanos a la neutralidad. Por lo tanto, en este sentido es más parecida a la pronasa E que a la aspartil proteinasa. La elección de esta enzima se hizo porque constituía una representante de las tiol proteinasas y, además, se ha usado ampliamente en la industria alimentaria para el ablandamiento de las carnes.

Las dosis de enzima empleadas fueron de 800 y 4500 unidades (la unidad enzimática se ha definido en el apartado II.3.1). La elección de estas cantidades se basó en los resultados obtenidos con la pronasa E, siguiendo el mismo razonamiento que el descrito en III.3 para la aspartil proteinasa, ya que, además, en el caso de esta enzima, se esperaba un comportamiento más parecido al de la pronasa E, dado que, como ya se ha dicho anteriormente, sus valores de pH óptimos son muy semejantes.

III.4.1. Evolución de los parámetros fisicoquímicos.

III.4.1.1. EXTRACTO SECO.

La evolución del extracto seco de los embutidos fabricados con papaína se muestra en la figura III.33. El contenido inicial de extracto seco (40,22%) fue similar al obtenido en los lotes con pronasa E (véase III.2.1.1) y aspartil proteinasa (véase III.3.1.1), al igual que la evolución, que fue ascendente, como era de esperar, durante el proceso madurativo.

A diferencia de los lotes con pronasa E y aspartil proteinasa, los embutidos con 4500 U. de papaína mostraron siempre valores superiores a los del control y a los elaborados con 800 U. de papaína, los cuales fueron casi siempre coincidentes. Es posible que esta enzima, a

dosis elevadas, genere péptidos que afecten más a la capacidad de retención de agua de las proteínas que las otras dos proteasas, lo que explicaría la diferencia en su extracto seco, más significativa al final del proceso (un 8% mayor que en los embutidos del lote control y de los de papaína-800 U.).

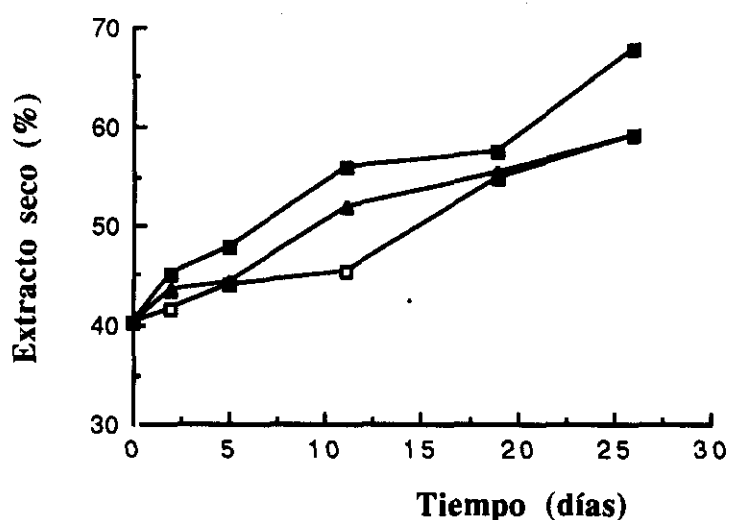


Figura III.33. Evolución del extracto seco en los embutidos elaborados con papaína. Control (□); lote con 800 U. (▲); lote con 4500 U. (■).

III.4.1.2. ACTIVIDAD DE AGUA (a_w).

La figura III.34 muestra la evolución de la actividad de agua de los embutidos elaborados con papaína. El valor inicial de la a_w de la masa sin embutir fue de 0,97, semejante al del lote con aspartil proteinasa (véase III.3.1.2), y descendió, como era de esperar, a lo largo de la maduración.

Al igual que ocurrió con los lotes elaborados con pronasa E y aspartil proteinasa, los embutidos elaborados con 4500 U. de papaína presentaron valores inferiores a los del control y a los del lote papaína-800 U. Los embutidos del lote papaína-4500 U. presentaron una a_w final de 0,77, muy inferior a la detectada en los lotes con mayor cantidad de pronasa E y

aspartil proteinasa. Al igual que en el caso de estas enzimas, este efecto se puede atribuir a la mayor proteólisis observada en estos embutidos (véase III.4.3), que condujo a un aumento de la concentración de compuestos de bajo peso molecular que poseen una mayor actividad osmótica. No obstante, al igual que en la pronasa E, el lote papaína-4500 U. mostró valores de extracto seco claramente superiores a los otros dos, lo que también pudo contribuir a que la a_w fuera menor.

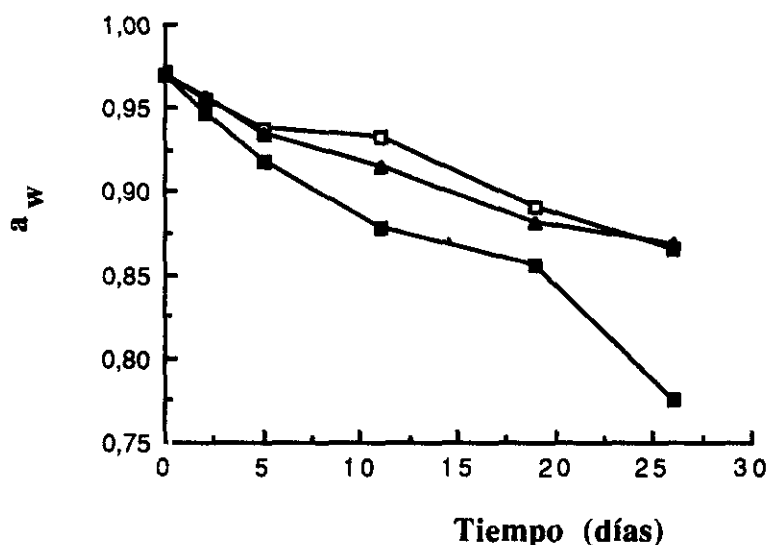


Figura III.34. Evolución de la actividad de agua (a_w) en los embutidos fabricados con papaína.
Control (□); lote con 800 U. (▲); lote con 4500 U. (■).

III.4.1.3. EVOLUCION DEL pH.

La evolución del pH a lo largo de la maduración en los embutidos fabricado con papaína se ha representado en la figura III.35. Dicha evolución fue semejante en todos los lotes y típica de esta clase de embutidos, como ya se ha indicado en capítulos anteriores. Al igual que en los embutidos con aspartil proteinasa (véase III.3.1.3), los valores fueron siempre más bajos que los observados en los elaborados con pronasa E incluido el control (véase III.2.1.3). De la misma forma que se explicó para los lotes con aspartil proteinasa, esta circunstancia se puede atribuir a las diferencias en la carne utilizada en la fabricación o,

también, a la distinta actividad de las bacterias lácticas presentes en la masa.

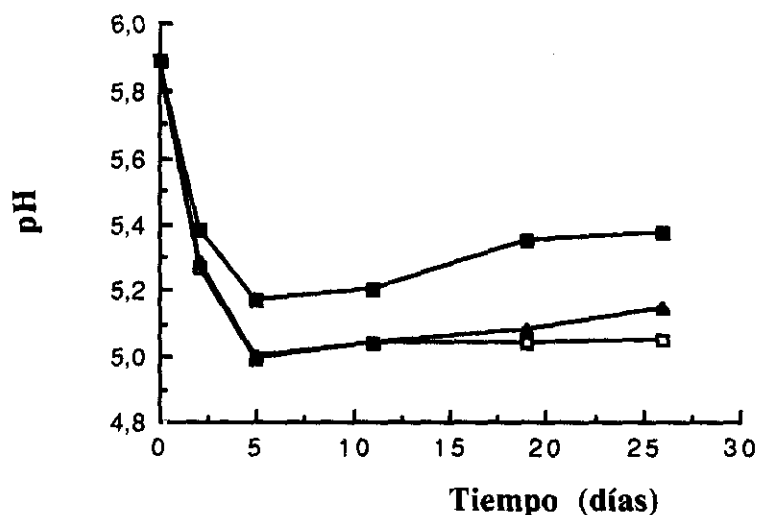


Figura III.35. Evolución del pH en los embutidos elaborados con papaína. Control (□); lote con 800 U. (▲); lote con 4500 U. (■).

Las diferencias en la evolución del pH de los tres lotes (control y adicionados de papaína) fueron similares a las observadas en los que contenían pronasa E. Así, los valores del lote control y los del de papaína-800 U. fueron muy semejantes durante todo el proceso madurativo, aunque al final sus gráficas divergieran ligeramente, mientras que los embutidos con 4500 U. de enzima presentaron un pH siempre más elevado (unas 0,2-0,3 unidades). Este hecho puede atribuirse a la acumulación de compuestos nitrogenados básicos procedentes de la degradación proteica en este lote. Además, los resultados parecen indicar que la degradación ocasionada por la papaína adicionada es, en cierto modo, bastante parecida a la provocada por la pronasa E; en ambos casos se liberan compuestos básicos en gran cantidad y afectan al pH, sobre todo en los lotes con grandes cantidades de enzimas. Por otra parte, los productos originados por la actividad de la aspartil proteinasa son, probablemente, distintos, con carácter predominantemente ácido (recuérdese que el Asp y el Glu estaban entre los aminoácidos que más aumentaban), haciendo que el pH de estos embutidos se mantuviera a niveles bajos.

III.4.1.4. CENIZAS.

En lo que se refiere al contenido de cenizas de los embutidos, véase III.1.1.4.

III.4.2. Evolución de la flora microbiana.

La figura III.36 muestra gráficamente la evolución de la flora microbiana total, la flora láctica y las micrococáceas de los lotes elaborados con papaína.

Los recuentos obtenidos en los tres lotes son, como se puede observar en las gráficas, prácticamente coincidentes, por lo que se puede decir que, al igual que en los embutidos con pronasa E y aspartil proteinasa, la adición de enzima no afectó en absoluto al crecimiento de los microorganismos más relevantes en la maduración de estos productos.

Los valores obtenidos en los recuentos de flora total y láctica fueron en todos los casos semejantes a los obtenidos en los lotes elaborados con las otras dos enzimas (compárese al efecto la figura III.36 y las figuras III.14 y III.26). El recuento de micrococáceas al inicio del proceso fue más parecido al obtenido en los lotes con aspartil proteinasa y, por lo tanto, más elevado que en los que contenían pronasa E; lo mismo sucedió con los valores hallados para estas bacterias en toda la maduración. El control mostró a partir del undécimo día, sin embargo, un descenso ligero que se prolongó hasta el final del proceso, cosa que no se observó en ninguno de los otros lotes de embutidos estudiados.

Se puede concluir, por lo tanto, que la adición de papaína, al igual que la de pronasa E y aspartil proteinasa, no influyó apreciablemente en el crecimiento microbiano.

III.4.3. Estudio de la proteólisis: evolución de diversas fracciones nitrogenadas.

III.4.3.1. NITROGENO TOTAL.

Respecto al contenido de nitrógeno total de los embutidos, véase III.1.3.1.

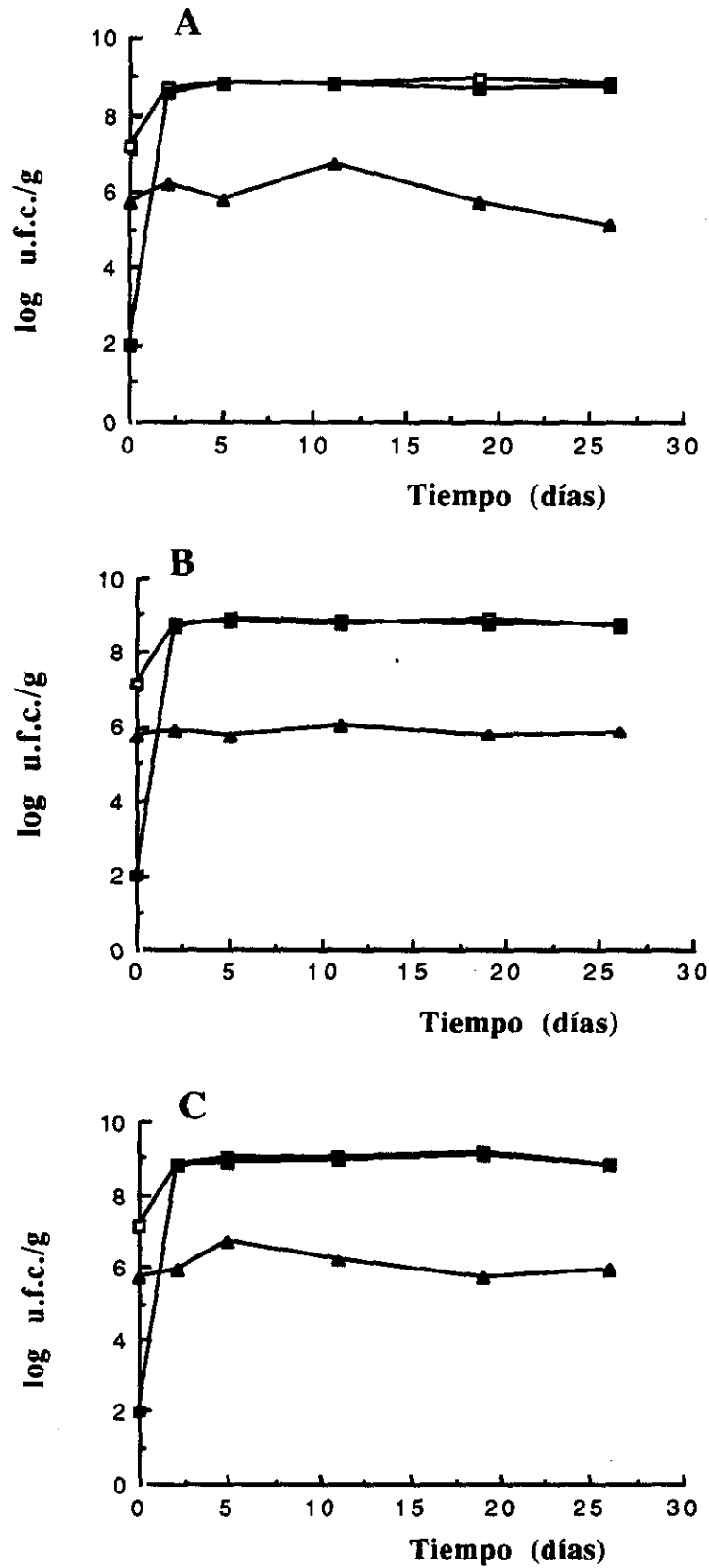


Figura III.36. Evolución de los microorganismos viables totales (□), de la flora láctica (■) y de las micrococáceas (▲) en los embutidos con papaína. A: control 3; B: lote con 800 U.; C: lote con 4500 U.

III.4.3.2. NITROGENO SOLUBLE EN AGUA (NSA).

La figura III.37 representa los resultados obtenidos al determinar el nitrógeno soluble en agua de los embutidos fabricados con papaína durante la maduración. Los valores se ofrecen en gramos de nitrógeno por 100 g de extracto seco.

Al igual que ocurrió en los lotes con pronasa E (véase III.2.3.2) y aspartil proteinasa (véase III.3.3.2), los embutidos con papaína presentaron un contenido en NSA más elevado que su control. Asimismo, el mayor incremento de esta fracción se produjo durante la fermentación para luego mantenerse, aunque con alguna oscilación, tanto en el control como en el lote papaína-800 U. En el lote papaína-4500 U., sin embargo, el incremento continuó hasta el día undécimo de la maduración, descendiendo después y estabilizándose al final del proceso. Este tipo de evolución se asemeja más al observado en los lotes con aspartil proteinasa que al que mostraron los embutidos con pronasa E, ya que no se detectó el descenso entre el segundo y quinto día de maduración. Los valores del lote papaína-800 U. se mantuvieron siempre próximos a los del control, aún siendo algo mayores, y bastante alejados de los del lote papaína-4500 U.. Algo similar ocurrió en el lote con 600 unidades de pronasa E respecto al que contenía 6000 U. Este comportamiento se puede ver claramente en los porcentajes finales de incremento respecto al control (tabla III.13). Los embutidos con menores dosis de pronasa E y papaína presentaron incrementos similares (35,6 y 36,9%, respectivamente). Esta mayor proximidad a los valores del control podría atribuirse a primera vista a su carácter de proteasas neutras antes mencionado. Sin embargo, el incremento alcanzado por el lote papaína-4500 U. fue superior al de los lotes con mayores cantidades de las otras dos enzimas, lo que indica que, al igual que la pronasa E, la papaína es activa y estable en las condiciones reinantes en los embutidos.

Los valores finales de NSA fueron de 1,11; 1,52 y 3,29 gN/100g de extracto seco en los embutidos control, con 800 y con 4500 unidades de papaína, respectivamente.

Del mismo modo que ocurrió con las otras dos enzimas, la proteólisis se produjo sobre todo al principio de la maduración, tendiendo luego a estabilizarse. La desaceleración

TABLA III.13. Incremento (%) al final de la maduración respecto al control de las fracciones nitrogenadas estudiadas en los embutidos fabricados con papaína.

Proteasa	Unidades	NSA	NNP	NSF	NSS	NBVT
Pronasa E	600	35,6	54,3	67,7	143,7	36,3
Pronasa E	6000	130,2	162,9	148,4	220,6	71,4
Aspartil proteinasa	800	54,8	206,2	136,4	234,9	83,8
Aspartil proteinasa	4500	134,9	306,2	175,7	521,9	151,1
Papaína	800	36,9	41,2	20	72,5	46,7
Papaína	4500	196,4	212,9	152,5	457,8	154,7

NSA: nitrógeno soluble en agua.

NNP: nitrógeno no proteico;

NSF: nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5%.

NSS: nitrógeno soluble en ácido sulfosalicílico al 5 %.

NBVT: nitrógeno básico volátil total.

de la actividad proteolítica puede deberse, como se ha dicho anteriormente para la pronasa E (véase III.1.3.2), a los cambios en las condiciones ambientales de la cámara (descenso de la temperatura), a la bajada del pH y, posiblemente, a algún mecanismo de retroinhibición enzimática.

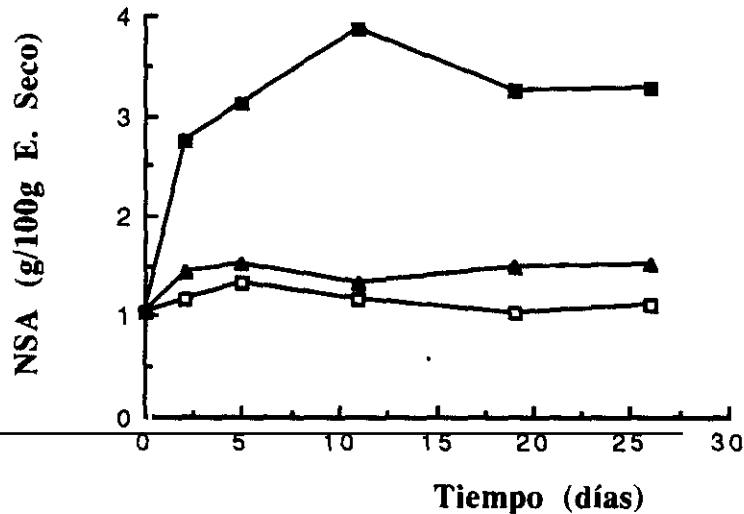


Figura III.37. Efecto de la adición de papaína en la fracción de nitrógeno soluble en agua (NSA).
Control (□); lote con 800 U. (▲); lote con 4500 U. (■).

III.4.3.3. NITROGENO NO PROTEICO (NNP).

La evolución a lo largo de la maduración del nitrógeno no proteico en los embutidos elaborados con papaína se muestra en la figura III.38. Los resultados se han expresado en gramos de nitrógeno por 100 g de extracto seco.

También en este caso, el contenido en NNP fue superior en los lotes con papaína que en el control y dependientes de la dosis de enzima añadida, observándose un comportamiento similar al de la fracción NSA, es decir, los valores de NNP fueron sólo algo mayores a los del control (apenas se multiplicaron por un factor de 1,5) en los embutidos fabricados con 800 U. de papaína y claramente superiores (casi se triplicaron) cuando se añadieron 4500 U. de la enzima.

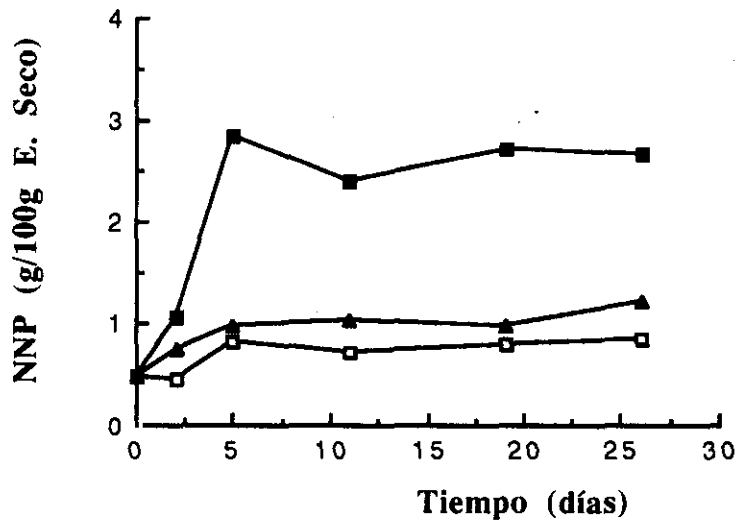


Figura III.38. Efecto de la adición de papaína en la fracción de nitrógeno no proteico (NNP).
Control (□); lote con 800 U. (▲); lote con 4500 U. (■).

La evolución del NNP en el lote papaína-4500 U. fue bastante similar a la de los lotes con mayor cantidad de pronasa E (véase III.2.3.3) y de aspartil proteinasa (III.3.3.3), existiendo un mayor incremento en los primeros días, un descenso ligero después y al final una estabilización de los valores. La única diferencia que se podría señalar es que el aumento inicial no se produjo sólo durante la fermentación sino que se prolongó hasta el quinto día del proceso. El lote papaína-800 U. mostró más similitudes con los lotes que contenían 600 unidades de pronasa E y 800 unidades de aspartil proteinasa.

Las tasas al final de la maduración fueron 0,85; 1,20 y 2,66 gN/100g de extracto seco en el control, embutidos con 800 y con 4500 unidades de papaína, respectivamente.

Los porcentajes de incremento respecto al control (tabla III.13) fueron mayores que los obtenidos en el NSA y en el NSF, como se verá posteriormente, lo que ocurrió también con la pronasa E y la aspartil proteinasa. Parece que la adición de enzimas proteolíticas induce mayores aumentos en los péptidos de gran tamaño molecular que en las fracciones más pequeñas.

El incremento del NNP observado en todos los lotes con las distintas enzimas

proteolíticas no ha sido detectado, sin embargo, por Næs y col. (1992) en embutidos a los que se les había añadido una proteinasa procedente de *Lactobacillus paracasei* sp *paracasei*, los cuales presentaron cifras semejantes a las de los embutidos de referencia. Sólo registraron ligeras variaciones en el contenido de algunos aminoácidos y en la degradación de las proteínas musculares. Es posible que las cantidades de enzimas utilizadas en las investigaciones que se describen en la presente memoria no sean comparables con las utilizadas por Næs y col. (1992) y realmente las empleadas por estos autores sean mucho menores que las usadas en el presente estudio. Téngase en cuenta que en nuestro caso eran enzimas comerciales y, por tanto, se disponía de un suministro abundante, mientras que en el caso de los autores antes mencionados la proteinasa se obtenía de una especie de lactobacilo, que si bien se puede extraer una cantidad suficiente para la caracterización de la enzima, no es posible conseguir una gran cantidad para llevar a cabo experiencias de esta naturaleza. Esta situación se complica si se tiene en cuenta que las bacterias lácticas, en general, no producen proteinasas extracelulares, sino ligadas a la pared (Exterkate, 1975; Laloi y col., 1991; Næs y Nissen Meyer, 1992), lo que implica una dificultad adicional para lograr una cantidad suficiente de enzima.

III.4.3.4. NITROGENO SOLUBLE EN ACIDO FOSFOTUNGSTICO AL 5% (NSF).

La figura III.39 muestra la evolución del nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5% a lo largo de la maduración de los embutidos fabricados con papaína. Los resultados se han expresado en porcentaje de extracto seco.

La evolución del NSF fue semejante a la observada en el NSA y el NNP. Asimismo, los lotes con papaína presentaron un mayor contenido en NSF que el control, proporcional además a la cantidad de enzima añadida. El mayor incremento no se produjo sólo durante la fermentación, sino que continuó, al igual que en el caso del NNP, hasta el quinto día de maduración, presentando entonces un máximo en el lote papaína-4500 U. para luego mantenerse estable. En el control y el lote papaína-800 U. los valores absolutos de NSF

fueron mucho menores y sólo ligeramente superiores a los hallados en el lote control. El máximo antes mencionado también apareció en los lotes con pronasa E (véase III.2.3.4), aunque se produjo durante la fase de fermentación. Los valores finales fueron de 0,41; 0,52 y 1,01 gN/100g de extracto seco en el lote control, con 800 y con 4500 unidades de papaína, respectivamente.

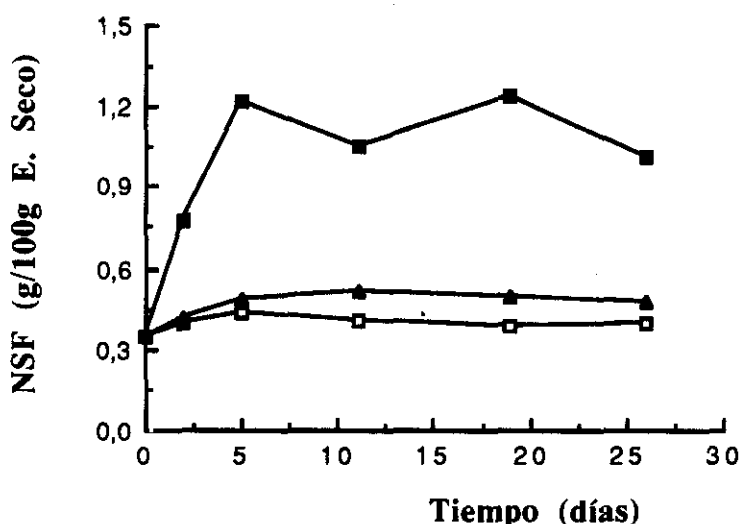


Figura III.39. Efecto de la adición de papaína en la fracción de nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5% (NSF).
Control (□); lote con 800 U. (▲); lote con 4500 U. (■).

Las principales diferencias observadas respecto a los embutidos fabricados con las otras proteinasas (pronasa E y aspartil proteinasa) son la influencia más destacada de la dosis en el contenido del NSF y el incremento más tardío que se produjo. El porcentaje de incremento respecto al control del lote papaína-800 U. fue muy reducido (tabla III.13) y mucho menor que los obtenidos en los embutidos con 600 y 800 unidades de pronasa E y aspartil proteinasa, respectivamente. A pesar de que esta dosis de papaína indujo un aumento del NSA similar al de la pronasa E y cercano al de la aspartil proteinasa, no degradó con la misma intensidad que éstas los polipéptidos producto de la degradación primaria de las proteínas. En cambio, el lote papaína-4500 U. mostró un incremento sólo superado en el lote aspartil proteinasa-4500 U., pese a que esta última enzima actuaba en condiciones de pH más

adecuadas. Al igual que la aspartil proteínasa, el incremento del NSF puede deberse a una acción indirecta del enzima, al liberarse más sustrato para la actividad de otras enzimas presentes en los embutidos (peptidasas tisulares y microbianas), como ya se expuso en III.2.3.4, dado que el extracto comercial de papaína no cuenta con carboxi- y aminopeptidasas, que sí posee la pronasa E.

III.4.3.5. NITROGENO SOLUBLE EN ACIDO SULFOSALICILICO AL 5% (NSS).

La figura III.40 muestra la evolución del nitrógeno soluble en ácido sulfosalicílico al 5% a lo largo de la maduración en los embutidos elaborados con papaína. Los resultados se han expresado en mg de nitrógeno en 100g de extracto seco.

Al igual que había sucedido en las otras fracciones nitrogenadas que se determinaron, el NSS se incrementó más en los embutidos elaborados con la enzima. El lote con 800 unidades de papaína mostró, al igual que las demás fracciones, una evolución casi paralela a la del control, aunque siempre con valores ligeramente superiores. Los embutidos con 4500 unidades de papaína presentaron una evolución creciente hasta algo más del undécimo día, tendiendo a estabilizarse después. Al comparar la evolución de esta fracción con la de los lotes fabricados con las otras proteinasas (pronasa E y aspartil proteínasa), se observó que en el caso de la papaína el comportamiento del NSS fue distinto. Cuando se añadió pronasa E (figura III.20) se produjo un incremento explosivo del NSS en la fase fermentativa y, tras un descenso posterior, se estabilizaron los valores correspondientes a esta fracción. En el caso de la aspartil proteínasa (figura III.30) el aumento fue progresivo a lo largo de todo el proceso madurativo y en los embutidos con papaína parece que los valores de la fracción NSS tienden a estabilizarse hacia fases avanzadas de la maduración. Los valores finales de NSS fueron 204 mgN/100g en el control, 352 mgN/100g en el lote papaína-800 U. y 1138 mgN/100g en el papaína-4500 U.

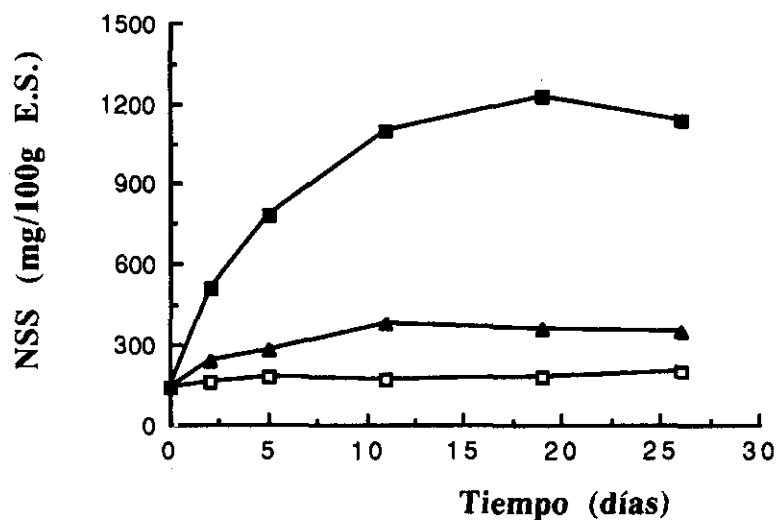


Figura III.40. Efecto de la adición de papaína en la fracción de nitrógeno soluble en ácido sulfosalicílico al 5% (NSS).
Control (□); lote con 800 U. (▲); lote con 4500 U. (■).

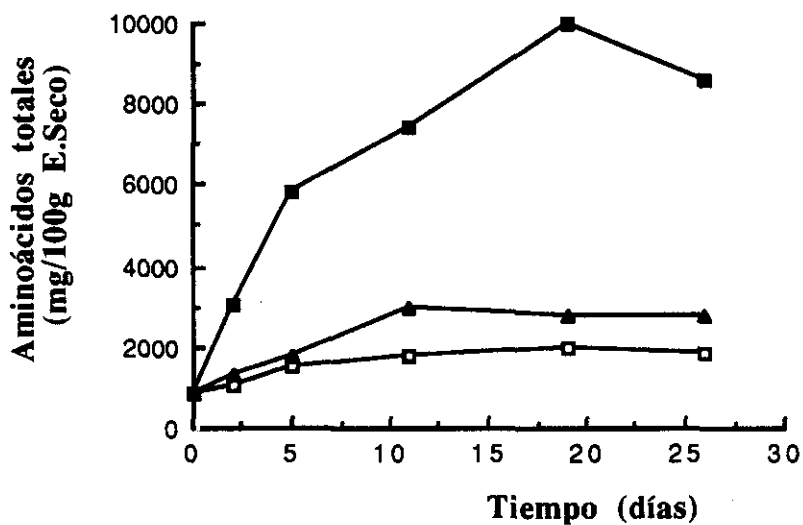


Figura III.41. Efecto de la adición de papaína en la evolución de los aminoácidos totales durante la maduración.
Control (□); lote con 800 U. (▲); lote con 4500 U. (■).

Los porcentajes de incremento respecto al control (tabla III.13) fueron, al igual que sucedió en los lotes con las otras dos proteinasas, muy superiores a los del resto de las

fracciones, viéndose también más afectados por la variación de las dosis de la enzima que éstas. Asimismo, mientras que en el control el contenido de NSF fue superior al de NSS (unos 400 y 150 mgN/100g E.S., respectivamente), en los lotes con papaína las cantidades de ambas fracciones fueron muy semejantes. Esta circunstancia también ocurrió en los embutidos con pronasa E (véase III.2.3.5). A la vista de estos resultados se puede decir que la adición de papaína ocasiona un mayor incremento de la concentración de la fracción aminoacídica.

III.4.3.6. NITROGENO BASICO VOLATIL TOTAL (NBVT).

La figura III.42 muestra la evolución del nitrógeno básico volátil total durante el período madurativo de los embutidos fabricados con papaína. Los resultados se han expresado en mg de nitrógeno en 100g de extracto seco.

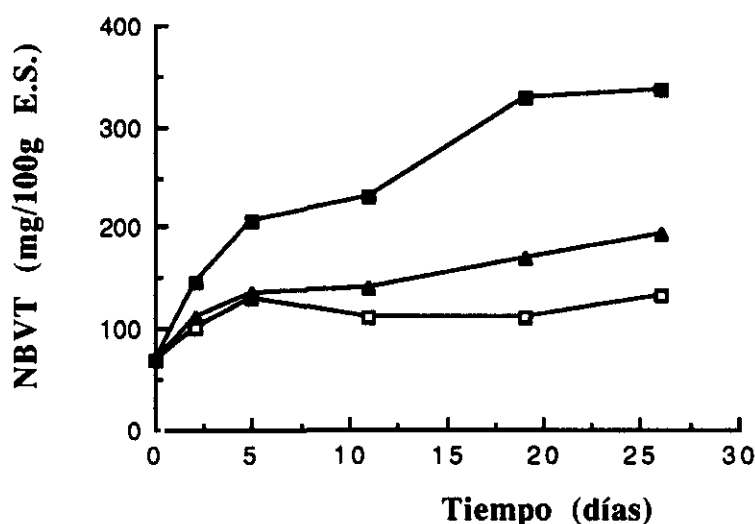


Figura III.42. Evolución del nitrógeno básico volátil total (NBVT) en los embutidos fabricados con papaína.
Control (□); lote con 800 U. (▲); lote con 4500 U. (■).

Durante la mayor parte de la maduración, los dos lotes con papaína mostraron un mayor contenido en NBVT que el control. No obstante, al principio del proceso y hasta el quinto día, el lote papaína-800 U. presentó valores casi coincidentes con los del control. Este

comportamiento fue similar al observado en el lote pronasa E-600 U. Posteriormente, y al igual que ocurrió en estos embutidos, las tasas de NBVT del lote papaína-800 U. aumentaron más que las del control para terminar siendo superiores. El lote papaína-4500 U., en cambio, mostró valores mucho más elevados desde el período fermentativo y su evolución fue muy semejante a la de los embutidos con 6000 unidades de pronasa E. El lote aspartil proteinasa-4500 U., por el contrario, mostró valores siempre crecientes.

Los contenidos finales de NBVT fueron 132,194 y 337 mgN/100g de extracto seco en el control, embutidos con 800 y con 4500 unidades de papaína, respectivamente.

El porcentaje de incremento final respecto al control (tabla III.13) del lote con 800 U. de papaína fue intermedio entre los lotes pronasa E-600 U. y aspartil proteinasa-800 U.. Sin embargo, el incremento del papaína-4500 U. fue superior al de los otros lotes con cantidades de enzima elevadas.

III.4.3.7. AMINOACIDOS LIBRES.

Los resultados obtenidos en la determinación de los aminoácidos libres durante la maduración de los lotes de embutidos elaborados con papaína se recogen en la tabla III.14. Los resultados se han expresado en mg de aminoácido en 100g de extracto seco.

Los lotes con papaína presentaron, en general, un mayor contenido en aminoácidos libres que el control, siendo superiores en el de papaína-4500 U. excepto en el caso de la cisteína, que alcanzó valores mayores en lote control. Los cinco aminoácidos mayoritarios en el lote papaína-800 U. fueron Glu, His, Lys, Leu y Ala, mientras que en el papaína-4500 U. lo fueron tres de éstos (Leu, Lys y Glu) y Trp e Ile. De estos aminoácidos, Glu y Lys predominaron también en el control. En cambio, la Leu sólo fue más abundante en los dos lotes con papaína, mientras que en el control no se encontraba entre los cinco primeros. La Tyr presentó una evolución semejante a la observada en los lotes con aspartil proteinasa (tabla III.10), es decir, se mantuvieron sus niveles en el lote papaína-800 U., al igual que en el aspartil proteinasa-800 U., y aumentaron en los dos lotes con mayor cantidad de ambas

TABLA III.14. Cambios en el contenido en aminoácidos libres (mg/100g E.S.) en los lotes de embutidos con papaina durante la maduración.

LOTE	Control 3							Papaina (800 U.)							Papaina (4500 U.)						
	0	2	5	11	19	26	0	2	5	11	19	26	0	2	5	11	19	26			
Asp	Tr	Tr	41	63	69	62	Tr	155	95	94	107	103	Tr	55	162	215	346	342			
Glu	134	226	322	386	440	386	134	145	306	495	412	460	134	307	523	714	1016	755			
Hpr	11	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	11	Tr	Tr	ND	Tr	Tr	11	ND	ND	Tr	ND	2			
Asn + Ser	Tr	18	14	Tr	19	22	Tr	24	16	38	42	38	Tr	128	240	324	366	340			
Gly + Gln	68	57	67	68	55	51	68	65	85	132	130	125	68	150	340	360	495	350			
His	210	230	269	312	293	287	210	226	266	361	367	359	210	283	509	538	786	542			
Thr	Tr	24	30	35	53	56	Tr	33	51	132	126	134	Tr	139	319	512	640	589			
Ala	65	74	130	135	138	132	65	94	150	231	229	224	65	226	571	540	703	571			
Pro	33	41	52	70	72	67	33	58	70	123	118	100	33	115	166	182	176	186			
Arg	24	Tr	10	Tr	Tr	Tr	24	ND	Tr	Tr	Tr	Tr	24	201	137	367	259	297			
Cys	97	97	88	109	179	200	97	131	73	215	162	181	97	79	69	139	120	151			
Tyr	24	Tr	29	25	15	14	24	Tr	31	32	21	22	24	41	38	52	99	87			
Val	33	41	67	83	99	86	33	66	109	204	186	171	33	148	35	420	568	480			
Met	46	12	19	30	36	36	46	23	30	66	41	48	46	114	276	286	330	375			
Ile	26	28	50	61	71	65	26	41	67	125	113	107	26	139	350	425	566	610			
Leu	34	52	107	129	145	124	34	79	141	241	238	216	34	352	794	887	1126	894			
Phe	26	31	58	73	79	67	26	44	79	139	128	122	26	163	353	408	550	540			
Trp	15	31	50	73	74	66	15	49	74	139	102	120	15	100	363	295	656	683			
Lys	27	72	94	133	149	129	27	93	136	230	253	235	27	315	602	786	1168	810			
TOTAL	873	1034	1497	1785	1986	1850	873	1326	1779	2997	2775	2765	873	3055	5847	7450	9970	8604			

ND: no detectado ; Tr: trazas
 Los valores encuadrados en el control corresponden a los aminoácidos que más se incrementaron a lo largo de la maduración.
 Los valores en negrita corresponden a los aminoácidos predominantes.

enzimas. Este comportamiento fue diferente al observado en los embutidos con pronasa E (tabla III.6), en los que siempre descendió. Al igual que ocurrió en los lotes con pronasa E y aspartil proteinasa, la lisina fue uno de los aminoácidos predominantes (véase III.2.3.7 y III.3.3.7).

Los aminoácidos que más aumentaron durante la maduración fueron diferentes en los dos lotes, si bien hay que tener en cuenta que el comportamiento de las fracciones nitrogenadas analizadas fue también muy distinto, ya que se observó una proteólisis muy acusada en el lote que contenía 4500 U. de papaína, mientras que el que contenía 800 U. estuvo bastante próximo al control. Los mayores incrementos de los valores finales respecto al control en el lote papaína-800 U. se registraron en Gly+Gln (x2,4), Thr (x2,4), Val (x2,0), Phe (x1,8), Trp (x1,8), Lys (x1,8) y Leu (x1,7), mientras que en el lote papaína-4500 U. el mayor aumento se presentó en Asn+Ser (x15,5), Thr (x10,5), Met (x10,4), Trp (x10,3) e Ile (x9,4).

La Arg mostró un comportamiento distinto en el lote con 4500 U. de papaína que el que se observó en los otros dos (el control y el de papaína-800 U.) y diferente también entre estos dos últimos y el detectado en los embutidos elaborados con pronasa E (tabla III.6) y aspartil proteinasa (tabla III.10). En la masa original (día 0) se detectaron 24 mg/100g E.S. y posteriormente sólo se determinaron indicios en el lote control y en el de papaína-800 U., mientras que en el resto de los lotes a los que anteriormente se ha hecho referencia se observó un incremento a lo largo del proceso madurativo. Este hecho puede estar relacionado con la actividad arginina-desamidasa de los lactobacilos que se ha discutido más ampliamente en el apartado III.1.3.7, que conlleva el descenso de los niveles de Arg. No quiere esto decir que en el lote papaína-4500 U. no se produjera también este efecto, sino que, en este caso, la velocidad de formación de Arg supera a la de su degradación. Ya se ha dicho repetidas veces en el presente apartado que la proteólisis que ocurrió en el lote papaína-800 U., aunque superior a la del lote control, estuvo bastante próxima a éste, mientras que en el lote papaína-4500 U. fue muy intensa.

En todos los casos se obtuvieron los valores máximos de aminoácidos libres en distintos momentos de la maduración y no al final de la misma, lo que parece indicar que la mayor liberación de estos compuestos se produce desde el período inmediatamente posterior a la fermentación, prolongándose más o menos en el tiempo. Este hecho está de acuerdo con lo observado en las demás fracciones nitrogenadas de mayor tamaño molecular que la aminoacídica, que presentaron este incremento en fases anteriores, fundamentalmente durante el período fermentativo, estabilizándose posteriormente sus niveles. Los aminoácidos son los compuestos finales de la degradación proteica catalizada por proteasas y, por tanto, deberían incrementarse con más intensidad en etapas algo más tardías, ya que se originan a partir de los péptidos liberados en las reacciones hidrolíticas previas. Este fenómeno se aprecia fácilmente en la figura III.41, en la que se ha representado la evolución de los contenidos totales de aminoácidos libres. Una evolución semejante se observó en el NSS; una vez más se puede afirmar, como ya se hizo anteriormente (véase III.2.3.7 y III. 3.3.7), que la determinación de esta fracción da una idea bastante segura del contenido en aminoácidos libres.

También parece que en un determinado momento, variable con el lote de embutido, las reacciones de liberación de aminoácidos dejan de ser intensas y empiezan a predominar las de degradación de los mismos (desaminación y descarboxilación), con lo que los valores de aminoácidos libres se estabilizan. El tiempo en que se produce este cambio puede quizá estar determinado por la actividad más o menos elevada de las enzimas microbianas y endógenas capaces de liberar aminoácidos en cada uno de los embutidos, lo que explicaría su variabilidad de unos lotes a otros.

III.4.3.8. AMINAS.

La tabla III.15 recoge los resultados obtenidos (mg/100g de extracto seco) en la determinación de las aminas presentes en los embutidos fabricados con papaína.

El análisis de los datos de dicha tabla permite deducir que para varias aminas

TABLA III.15. Cambios en el contenido en aminas (mg/100g E.S.) en los embutidos fabricados con papaína.

Lote	Control							Papaína (800 U.)							Papaína (4500 U.)												
	0	2	5	11	19	26		0	2	5	11	19	26		0	2	5	11	19	26		0	2	5	11	19	26
Triptamina	5,3	3,7	10,2	6,1	8,9	6,1		5,3	8,2	9,8	9,6	9,7	9,8		5,3	6,7	16,7	18,3	21,2	12,9							
2-Feniletilamina	3,2	Tr	3,8	Tr	2,8	1,8		3,2	4,8	Tr	3,7	Tr	Tr		3,2	Tr	2,7	Tr	4,1	3,2							
Putrescina + Histamina	Tr	4,7	19,5	27,3	26,7	29,7		Tr	3,9	33	54,2	70,2	65,7		Tr	2,8	2,5	27,2	47,7	43,6							
Espermidina	1,7	1,7	3,3	Tr	2	1,7		1,7	Tr	1,6	Tr	1,8	1,8		1,7	Tr	Tr	2,1	Tr	1,5							
Espermina	11,7	13,9	13,4	13,2	13	13,2		11,7	7,1	12,7	9,1	13,9	12,1		11,7	7,2	8,2	8,5	4,2	7,9							
Tiramina	Tr	5,9	10,8	13,6	8,2	8		Tr	4,7	18,2	11	23,6	8,5		Tr	19,9	62,2	26,7	13,5	29,5							
Cadaverina	ND	ND	Tr	28,5	21,3	25,5		ND	ND	Tr	42	25,7	28,4		ND	Tr	27,2	20,6	29,9	24,3							

Tr.- trazas; ND.- no detectado

(2-feniletilamina, espermidina y espermina) fueron similares a los registrados en los lotes con pronasa E y aspartil proteinasa. Sin embargo, en el caso de los embutidos con papaína sí se observó un incremento apreciable no sólo de tiramina sino también de putrescina+histamina y cadaverina. La triptamina también aumentó durante la maduración pero de forma menos acusada que las diaminas anteriores. Los incrementos observados para la putrescina+histamina y cadaverina no parecen deberse a la adición de papaína, ya que la cadaverina alcanzó valores similares tanto en el control como en los lotes de embutidos que contenían papaína y, en el caso de la putrescina+histamina, fue el lote con 800 U. de papaína en el que se alcanzaron las cifras mayores y no el de 4500 U. como sería de esperar si el incremento se debiera a la acción de la proteinasa. Por tanto, parece más lógico atribuir el aumento a otras causas, probablemente a la flora microbiana que se instaló en la masa, como ya se ha discutido en el apartado III.1.3.8 al analizar las aminas de los controles.

Respecto a la tiramina, la evolución fue similar a la observada en los embutidos con pronasa E y aspartil proteinasa, experimentando los valores un incremento más acusado durante la primera mitad de la maduración y estabilizándose después. No obstante, los valores absolutos fueron muy inferiores a los detectados en los lotes con pronasa E (entre 3 y 7 veces menos) y, en cambio, bastante parecidos a los que presentaron los embutidos con aspartil proteinasa. Todas las consideraciones hechas para los lotes de embutidos fabricados con las otras dos proteinasas son válidas, pues, para este lote.

Desde el punto de vista sanitario, para alcanzar los valores mínimos de tiramina que cita Renner (1987) como capaces de producir toxicidad (10 mg) deberían consumirse aproximadamente 213 g de embutidos control, 200 g de los que contenían 800 unidades de papaína y sólo 50 g de los embutidos con 4500 unidades. Si se considera un consumo normal de embutido de 50 a 100 g, los lotes control y papaína-800 U. no presentarían peligro ni siquiera para los individuos susceptibles. En el caso del lote papaína-4500 U. la ingestión de estas cantidades podría desencadenar desórdenes en personas sensibles.

Ponto y col. (1977) señalan que la cantidad mínima de tiramina suficiente para

interaccionar con los medicamentos IMAO es de 6 mg; en este caso, ingestas algo superiores a 100 g de los embutidos control y los de papaína-800 U. ya podrían causar problemas. Respecto a la producción de migrañas, se necesitan unos 125 mg de tiramina para desencadenar el proceso (Hannington y col., 1970), por lo que se necesitaría ingerir cantidades elevadísimas de estos embutidos para que se alcanzaran estas cifras.

Por lo que refiere a la putrescina+histamina y considerando, en este caso, la cifra mínima de 70 mg señalada por Renner (1987) como tóxica, serían necesarios casi 400 g de embutidos del lote control, 180 g del de papaína-800 U. y aproximadamente 250 g del de papaína-4500 U. Para realizar este cálculo se ha considerado que la putrescina está presente en cantidades mínimas y que la cifra detectada correspondió mayoritariamente a la histamina, dado que las bacterias predominantes en los embutidos no producen putrescina (Dainty y col., 1986). Son cantidades que superan las consideradas como normales en una ingesta de embutido.

Por lo tanto se puede decir que el lote con 800 unidades de papaína no era potencialmente peligroso ni siquiera para individuos susceptibles y menos aún para personas normales, capaces de tolerar cantidades muy superiores. El lote con 4500 unidades, como veremos a continuación, no sería aceptado por los consumidores por sus defectos en la textura, por lo que su toxicidad no tendría importancia.

III.4.4. Análisis sensorial.

La prueba de diferenciación por el test triangular mostró que el lote con 800 unidades de papaína no fue significativamente diferente del control ($p \geq 0,05$). En cambio, los embutidos con 4500 unidades sí fueron diferentes ($p < 0,01$) del control y, por lo tanto, también del lote con 800 unidades. Estas diferencias se debieron a un ablandamiento excesivo de la masa como consecuencia de la intensa proteolisis.

La tabla III.16 muestra las puntuaciones obtenidas por los embutidos con papaína en

Tabla III.16. Calidad organoléptica al final de la maduración de los embutidos fabricados con papaína.

Lote	Unidades añadidas*	Color y Apariencia	Textura	Sabor y Aroma	Calidad global**
Control	0	7,7a	7,1a	7,1a	7,1a
Papaína-800	800	7,2a	6,2b	7,1a	6,9a
Papaína-4500	4500	3,5b	2,5c	3,2b	3,0b

a, b, c: letras diferentes representan diferencias significativas ($p \leq 0,01$).

* Para la definición de unidad, ver apartado II.3.1

** Calidad global = Color y Apariencia x 0,1 + Textura x 0,25 + Sabor y Aroma x 0,65

la prueba preferencial. El lote con 800 U. presentó puntuaciones ligeramente inferiores a las del control en cuanto a color+apariencia y a textura, siendo esta última peor considerada y diferente a la textura de los embutidos control. Sin embargo, ambos lotes alcanzaron la misma puntuación en sabor y aroma. La calidad global fue algo mejor en los embutidos del control, aunque la diferencia con los del lote papaína-800 U. fue muy pequeña.

El lote papaína-4500 U. mostró, en cambio, unas puntuaciones claramente inferiores a las de los otros dos lotes, lo cual se corresponde con la diferenciación estadísticamente significativa resultante de la prueba triangular. El valor más bajo se obtuvo en la evaluación de la textura, al igual que en los otros dos lotes con elevada cantidad de pronasa E (véase III.2.4) y aspartil proteinasa (véase III.3.4), debido al excesivo ablandamiento del embutido. En cuanto a sabor y aroma, la puntuación fue más semejante a la del lote pronasa E-6000 U. que la del aspartil proteinasa-4500 U., es decir, muy baja.

Considerando estos resultados, se puede decir que la papaína empleada en cantidades próximas a las 800 unidades (probablemente más bajas debido a su efecto sobre la textura) podría ser útil para potenciar el sabor y aroma de los embutidos, aunque sería necesario ajustar más la dosis. En cuanto a su uso en la fabricación de productos cárnicos de características diferentes, tal y como se propuso respecto a la aspartil proteinasa (véase III.3.4) esta enzima sería en principio descartable, dado que en cantidades elevadas empeora de forma considerable el sabor y aroma del producto.

III.5. APROXIMACION A LAS DOSIS OPTIMAS DE PROTEASAS.

Los resultados descritos en los capítulos anteriores han mostrado que la adición de enzimas acelera los fenómenos proteolíticos que acaecen en un embutido en maduración y, lo que es más importante, produce una gran liberación de aminoácidos que son las sustancias más relevantes derivadas de la degradación proteica en lo que respecta al sabor y aroma, ya que, por ellos mismos, contribuyen al sabor o quedan disponibles para sufrir transformaciones posteriores y participar así en el sabor y aroma del producto final.

Sin embargo, las dosis empleadas no ocasionaron una mejora de la calidad organoléptica, salvo en un caso (lote pronasa E-600 U.) y en éste sólo se consiguió una mejora tan ligera en la calidad global que ni siquiera llegó a ser estadísticamente significativa. Por el contrario, excepto en los embutidos de este lote, el análisis sensorial reveló que en todos los demás lotes se producían serios defectos de la textura debidos a un ablandamiento excesivo que derivó, sin duda, de la proteolisis tan extensa y profunda que se produjo y que llevó a la generación de polipéptidos, péptidos y aminoácidos libres de mayor solubilidad que las proteínas de procedencia. Este efecto fue variable dependiendo de la proteinasa utilizada y de la dosis de la misma empleada, pero en el caso de la aspartil proteinasa de *Aspergillus oryzae* este fenómeno fue espectacular, ya que incluso con la dosis más baja de la enzima (800 U.) el ablandamiento fue muy intenso.

En otro orden de cosas, el análisis de las aminas potencialmente tóxicas reveló que la adición de algunas de las proteinasas provocaba una liberación excesiva de los aminoácidos precursores que quedaban disponibles para su descarboxilación por los microorganismos presentes, lo que conducía a la acumulación excesiva de dichas aminas que alcanzaron, en algunos casos, tasas no deseables.

Todas estas consideraciones llevaron a la autora de la presente memoria a concluir que la dosis de proteinasas eran, en todos los casos, excesivas.

En un intento de profundizar en la posibilidad de utilizar proteinasas para acortar el

período madurativo de los embutidos o, alternativamente, potenciar el sabor y aroma, y teniendo en cuenta los antecedentes antes descritos, se programó la experiencia que se describe en el presente apartado. Los resultados obtenidos previamente aconsejaron disminuir las dosis de las tres proteinasas. De este modo, se pensó que las dosis más adecuadas podían ser de 300 U. para la pronasa E y de 500 U. para la papaína. En el caso de la aspartil proteinasa se creyó conveniente reducir la dosis mucho más, dado que cuando se utilizaron 800 U. se produjo un intenso ablandamiento. Por ello, se estableció como posible dosis idónea la de 100 U.

III.5.1. Evolución de los parámetros fisicoquímicos.

En las figuras III.43, III.44 y III.45 se representan las evoluciones del extracto seco, a_w y pH, respectivamente. No es necesario abundar en los resultados; todos fueron similares a los obtenidos en las experiencias realizadas previamente. Los análisis microbiológicos no se realizaron en estas experiencias, dado que cantidades mayores de las tres enzimas no afectaron en absoluto (véase figuras correspondientes de los capítulos anteriores) a la evolución de los microorganismos que participan en la maduración.

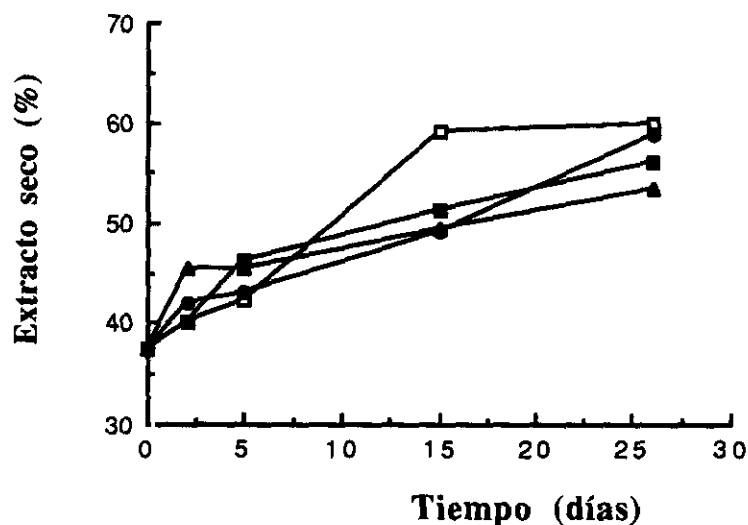


Figura III.43. Evolución del extracto seco en los embutidos elaborados con pronasa E, aspartil proteinasa y papaína.

Control (□); lote con 300 U. de pronasa E (■); lote con 100 U. de aspartil proteinasa (▲); lote con 500 U. de papaína (●).

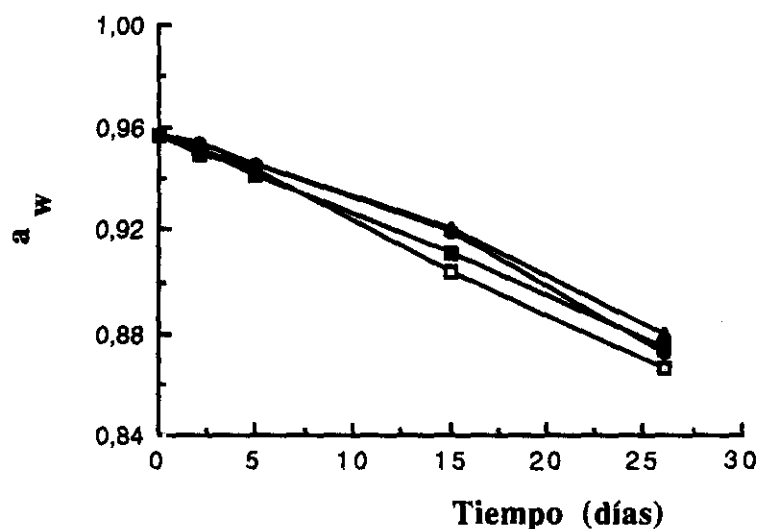


Figura III.44. Evolución de la actividad de agua (a_w) en los embutidos elaborados con pronasa E, aspartil proteinasa y papaína.

Control (□); lote con 300 U. de pronasa E (■); lote con 100 U. de aspartil proteinasa (▲); lote con 500 U. de papaína (●).

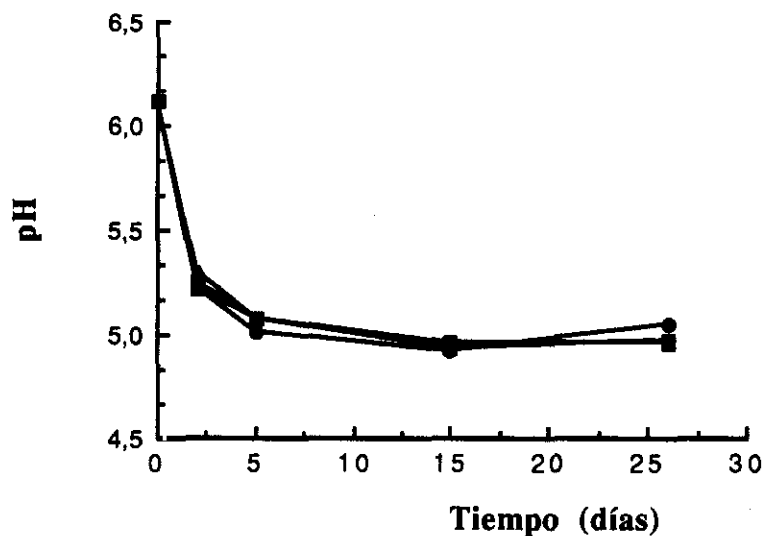


Figura III.45. Evolución del pH en los embutidos elaborados con pronasa E, aspartil proteínasa y papaína.
Control (□); lote con 300 U. de pronasa E (■); lote con 100 U. de aspartil proteínasa (▲); lote con 500 U. de papaína (●).

III.5.2. Evolución de las fracciones nitrogenadas.

III.5.2.1. NITROGENO SOLUBLE EN AGUA, NO PROTEICO, SOLUBLE EN ACIDO FOSFOTUNGSTICO AL 5%, SOLUBLE EN ACIDO SULFOSALICILICO AL 5% Y BASICO VOLATIL TOTAL.

Las evoluciones de las fracciones de nitrógeno soluble en agua (NSA), nitrógeno no proteico (NNP) y nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5% (NSF) del lote control y de los lotes fabricados con las tres proteínasas se recogen, en términos de porcentaje de extracto seco, en las figuras III.46, III.47 y III.48.

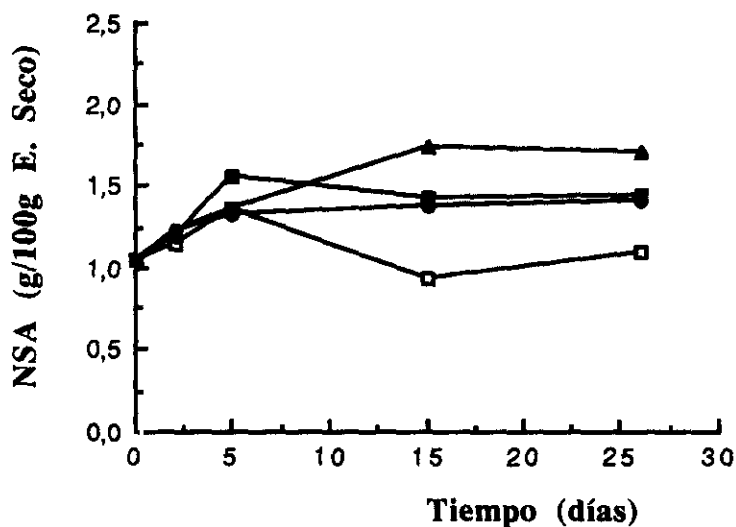


Figura III.46. Efecto de la adición de pronasa E, aspartil proteinasa y papaína en la evolución del nitrógeno soluble en agua (NSA).
Control (□); lote con 300 U. de pronasa E (■); lote con 100 U. de aspartil proteinasa (▲); lote con 500 U. de papaína (●).

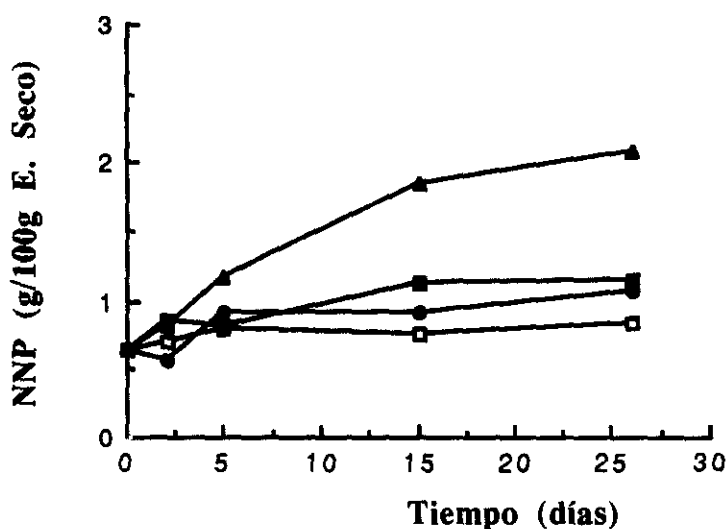


Figura III.47. Efecto de la adición de pronasa E, aspartil proteinasa y papaína en la evolución del nitrógeno no proteico (NNP).
Control (□); lote con 300 U. de pronasa E (■); lote con 100 U. de aspartil proteinasa (▲); lote con 500 U. de papaína (●).

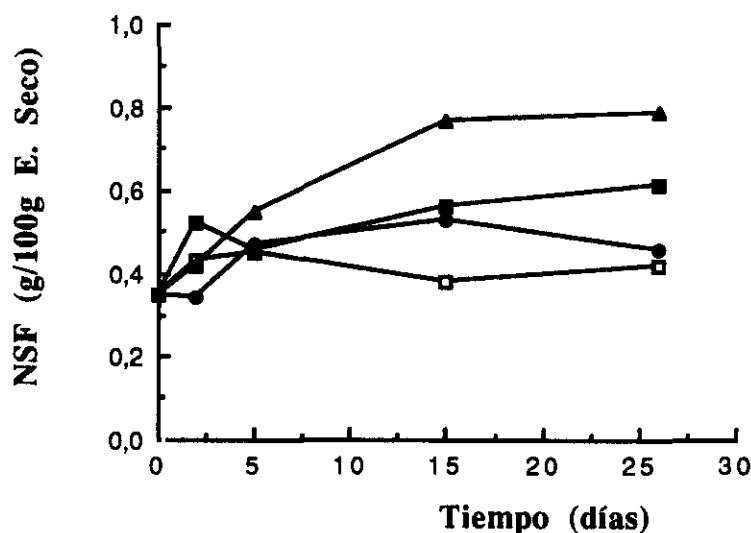


Figura III.48. Efecto de la adición de pronasa E, aspartil proteinasa y papaína en la evolución del nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5%. Control (□); lote con 300 U. de pronasa E (■); lote con 100 U. de aspartil proteinasa (▲); lote con 500 U. de papaína (●).

En los tres lotes fabricados con las proteinasas y para las tres fracciones nitrogenadas se observó un comportamiento similar; en todos ellos siempre se obtuvieron valores superiores a los hallados para el control, siendo los más elevados en las tres fracciones los que alcanzaron los embutidos elaborados con 100 U. de aspartil proteinasa, a pesar de que fue la enzima que se añadió en menor cuantía. En los lotes a los que se añadieron pronasa E (300 U.) y papaína (500 U.) se alcanzaron valores similares. No cabe duda de que la mayor proteólisis observada en el lote preparado con aspartil proteinasa se debe a que esta enzima es una proteinasa ácida con un pH óptimo de actuación próximo al de los embutidos, mientras que la actividad óptima de las otras dos se sitúa en torno a la neutralidad.

En cuanto a los resultados obtenidos en este experimento en relación con los hallados en experiencias anteriores en las que se utilizaron dosis mayores de las tres enzimas (véanse apartados III.2.3, III.3.3 y III.4.3), hay que decir que, en términos generales, son concordantes con la cantidad de enzima añadida para las fracciones NSA y NNP, es decir, los niveles obtenidos de ambas fracciones fueron sólo ligeramente inferiores (lote de pronasa

E 300 U. respecto a lote de pronasa E 600 U. y lote de papaína 500 U. respecto al lote de papaína 800 U. para la fracción NSA) o claramente inferiores (lote aspartil proteínasa 100 U. respecto al de aspartil proteínasa 800 U. para el NSA y los lotes fabricados con las dosis más bajas de las tres enzimas respecto a los elaborados con dosis mayores, para el NNP) a los de los lotes de embutidos adicionados con la correspondiente proteínasa pero a dosis más elevadas. Este efecto puede observarse clara y detalladamente en la tabla III.17, donde se expresan los porcentajes de incrementos al final de la maduración respecto al control. Los porcentajes de incremento, tanto para el NSA como para el NNP, de los lotes pronasa E-300, aspartil proteínasa-100 y papaína-500 siempre fueron más bajos que los correspondientes a cada una de las fracciones de pronasa E-600 U., aspartil proteínasa-800 U. y papaína-800 U. y, por supuesto, mucho menores que cuando se añadieron a los embutidos 6000 U. de pronasa E y 4500 de aspartil proteínasa o papaína.

Los valores absolutos obtenidos para la fracción NSF (fig. III.48) fueron, en cambio, aproximadamente iguales a los obtenidos para las correspondientes tasas halladas en los lotes pronasa E-600 U. (figura III.19), aspartil proteínasa-800 U. (figura III.29) y papaína-800 U. (figura III.39). Sin embargo, los porcentajes de incremento respecto a su control correspondiente fueron superiores en los tres casos, como reflejan los datos de la tabla III.17.

En la figura III.49 se muestran los resultados obtenido para el nitrógeno soluble en ácido sulfosalicílico al 5% y en la figura III.50 la correspondiente a la tasa total de aminoácidos de los embutidos fabricados con 300 U. de pronasa E, 100 U. de aspartil proteínasa y 500 U. de papaína. Estos resultados son coincidentes con los descritos anteriormente para las otras fracciones nitrogenadas analizadas, ya que los valores de los lotes fabricados con pronasa E y papaína fueron bastante semejantes e inferiores a los que se alcanzaron en el lote preparado con la aspartil proteínasa.

TABLA III.17. Incremento (%) al final de la maduración respecto al control de las fracciones nitrogenadas estudiadas en los embutidos fabricados con las tres proteasas.

Proteasa	Unidades	NSA	NNP	NSF	NSS	NBVT
Pronasa E	600	35,6	54,3	67,7	143,7	36,3
Pronasa E	6000	130,2	162,9	148,4	220,6	71,4
Aspartil proteinasa	800	54,8	206,2	136,4	234,9	83,8
Aspartil proteinasa	4500	134,9	306,2	175,7	521,9	151,1
Papaína	800	36,9	41,2	20	72,5	46,7
Papaína	4500	196,4	212,9	152,5	457,8	154,7
Pronasa E	300	30,2	36,9	45,2	84,5	28,5
Aspartil proteinasa	100	45,1	148,8	88,1	171,4	64,2
Papaína	500	28,2	28,6	9,5	63,4	39,1

NSA: nitrógeno soluble en agua.

NNP: nitrógeno no proteico;

NSF: nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5%.

NSS: nitrógeno soluble en ácido sulfosalicílico al 5 %.

NBVT: nitrógeno básico volátil total.

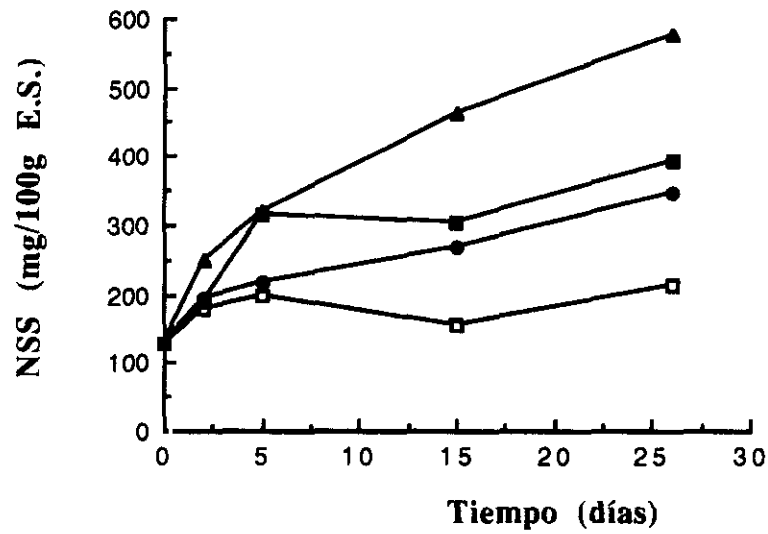


Figura III.49. Efecto de la adición de pronasa E, aspartil proteínasa y papaína en la evolución del nitrógeno soluble en ácido sulfosalicílico al 5%. Control (□); lote con 300 U. de pronasa E (■); lote con 100 U. de aspartil proteínasa (▲); lote con 500 U. de papaína (●).

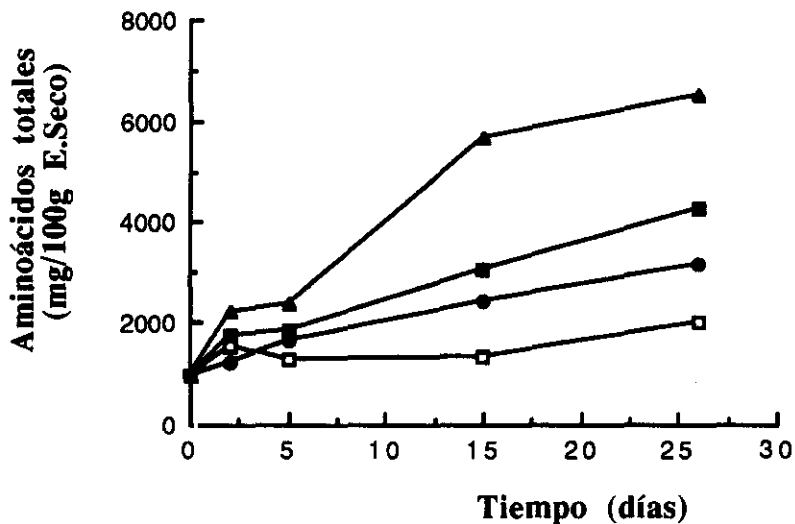


Figura III.50. Efecto de la adición de pronasa E, aspartil proteínasa y papaína en la evolución de los aminoácidos totales. Control (□); lote con 300 U. de pronasa E (■); lote con 100 U. de aspartil proteínasa (▲); lote con 500 U. de papaína (●).

No ocurrió lo mismo en relación con los resultados descritos en los apartado

anteriores, cuando se fabricaron otros lotes de embutidos con cantidades mayores de las tres enzimas. Comparando los datos de las dos gráficas anteriores (ya se ha comentado en III.2.3.7 que las fracciones NSS son equivalentes a la de aminoácidos totales) con los correspondientes de los capítulos precedentes para la pronasa E (figuras III.20 y III.21), aspartil proteinasa (figuras III.30 y III.31) y papaína (figuras III.40 y III.41) se puede deducir que los aminoácidos totales liberados alcanzaron unos valores aproximadamente iguales en todos los casos. Quiere esto decir que la menor adición de cualquiera de las tres enzimas provoca, en términos generales, una menor fragmentación de las proteínas para rendir los polipéptidos y péptidos componentes de las fracciones NSA, NNP y NSF pero no de aminoácidos libres, lo que parece indicar que con menor cantidad de enzima se suministra una cantidad suficiente de los péptidos precursores de aminoácidos.

Sin embargo, no hubo diferencias claras en el nitrógeno básico volátil total (figura III.51) entre los lotes fabricados con 300 U. de pronasa E, 100 U. de aspartil proteinasa y 500 U. de papaína; puede observarse en la figura que al final de la maduración las tasas alcanzadas por los tres lotes estuvieron comprendidas entre 150 y 180 mg/100g E.S.. Es posible que el NBVT esté relacionado con la actividad propia de la microflora que se implanta. No se olvide que la masa original de los tres lotes con las distintas proteinasas y el control era la misma. El hecho de que los valores del NBVT sean más bajos en el control que en los lotes con enzima puede atribuirse a que haya una cantidad significativamente menor de aminoácidos en el control y se produzca, en consecuencia, la desaminación de los mismos en menor cuantía.

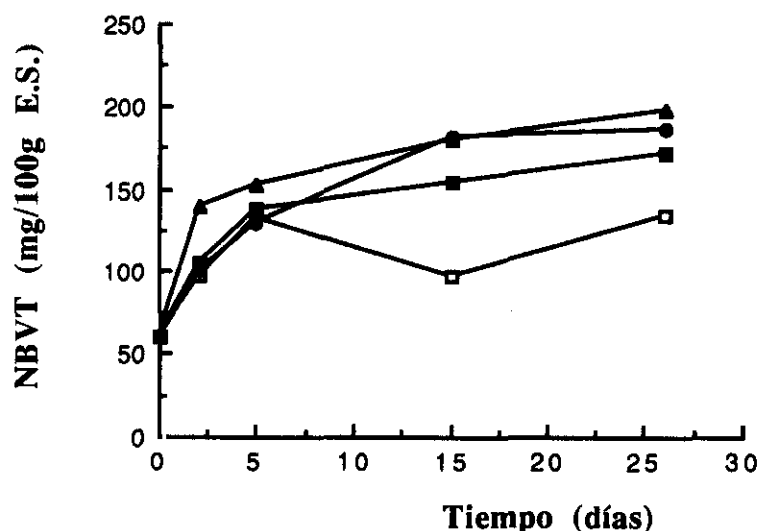


Figura III.51. Efecto de la adición de pronasa E, aspartil proteinasa y papaína en la evolución del nitrógeno básico volátil total (NBVT).
Control (□); lote con 300 U. de pronasa E (■); lote con 100 U. de aspartil proteinasa (▲); lote con 500 U. de papaína (●).

III.5.2.2. AMINOACIDOS LIBRES Y AMINAS.

La tabla III.18 muestra los cambios en las tasas de aminoácidos libres en los embutidos fabricados con 300 U. de pronasa E, 100 U. de aspartil proteinasa y 500 U. de papaína. El análisis detallado de la tabla permite deducir una serie de conclusiones generales. Diversos aminoácidos (Glu, His, Ala, Leu y Lys) fueron, en los tres lotes, los más abundantes al final de la maduración. De estos, la Lys estuvo también entre los que aumentaron de forma más acusada en los tres lotes respecto a la cantidad final hallada en el control. Otros aminoácidos que sufrieron también un gran incremento fueron el Asp, Pro, Ile y Asn+Ser en los tres lotes; la Met en los lotes con aspartil proteinasa y con papaína. Asimismo, puede decirse que otros aminoácidos (Cys, Tyr, Trp y Arg) aumentaron sólo ligeramente o se mantuvieron a niveles regulares durante todo el proceso madurativo. El hecho de que, independientemente de la proteinasa, la mayoría de los aminoácidos mostrara un comportamiento similar inclina a deducir que las proteinasas fragmentan las proteínas rindiendo péptidos pequeños, que quedan dispuestos para ser degradados activamente por la

TABLA III.18. Cambios en el contenido en aminoácidos libres (mg/100g E.S.) en los embutidos fabricados con pronasa E, aspartil proteinasa y papaína durante la maduración.

LOTE	Control 4						Pronasa (300 U.)						Aspartil proteinasa (100 U.)						Papaína (500 U.)											
	0	2	5	15	26		0	2	5	15	26		0	2	5	15	26		0	2	5	15	26		0	2	5	15	26	
Asp	Tr	24	Tr	45	49		Tr	21	28	94	149		Tr	43	70	200	229		Tr	15	117	121	125		Tr	15	117	121	125	
Glu	148	332	260	268	318		148	266	243	371	696		148	312	354	808	967		148	204	279	388	441		148	204	279	388	441	
Hpr	ND	ND	ND	Tr	Tr		ND	Tr	ND	ND	ND		ND	ND	ND	ND	Tr		ND	Tr	ND	Tr	Tr		ND	Tr	ND	Tr	Tr	
Asn + Ser	21	34	29	35	62		21	59	63	115	162		21	75	85	208	259		21	37	46	78	114		21	37	46	78	114	
Gly + Gln	96	115	91	78	105		96	127	123	174	211		96	137	128	284	320		96	104	116	162	202		96	104	116	162	202	
His	229	361	260	227	346		229	277	269	390	483		229	306	270	557	630		229	236	248	378	385		229	236	248	378	385	
Thr	20	36	28	52	91		20	45	57	145	234		20	80	112	265	321		20	31	54	92	149		20	31	54	92	149	
Ala	81	148	127	112	209		81	157	191	317	410		81	187	191	486	620		81	124	130	239	282		81	124	130	239	282	
Pro	46	93	78	73	118		46	105	113	163	253		46	101	90	210	282		46	73	89	128	167		46	73	89	128	167	
Arg	28	ND	ND	19	Tr		28	ND	ND	Tr	61		28	Tr	20	44	98		28	ND	ND	Tr	45		28	ND	ND	Tr	45	
Cys	51	Tr	40	29	44		51	66	Tr	29	46		51	43	Tr	49	54		51	Tr	36	52	63		51	Tr	36	52	63	
Tyr	18	Tr	Tr	Tr	Tr		18	7	16	23	29		18	18	25	47	56		18	12	15	23	22		18	12	15	23	22	
Val	32	62	57	65	108		32	95	122	214	274		32	109	153	365	428		32	64	88	144	192		32	64	88	144	192	
Met	18	25	19	23	31		18	27	29	74	49		18	52	62	170	179		18	21	27	53	69		18	21	27	53	69	
Ile	20	39	39	47	79		20	70	92	156	185		20	102	125	268	306		20	42	58	83	129		20	42	58	83	129	
Leu	36	94	94	101	178		36	140	194	319	359		36	211	254	592	637		36	98	119	183	284		36	98	119	183	284	
Phe	19	38	48	52	86		19	71	93	157	191		19	104	125	310	312		19	47	61	106	147		19	47	61	106	147	
Trp	36	37	9	10	8		36	38	11	24	26		36	65	36	53	34		36	22	24	31	24		36	22	24	31	24	
Lys	80	121	99	88	169		80	171	186	324	462		80	258	283	735	804		80	99	119	186	315		80	99	119	186	315	
TOTAL	979	1559	1278	1324	2001		979	1742	1830	3089	4280		979	2203	2383	5651	6536		979	1226	1626	2447	3155		979	1226	1626	2447	3155	

ND: no detectado ; Tr: Trazas.
 Los valores encuadrados en el control corresponden a los aminoácidos que más se incrementaron a lo largo de la maduración.
 Los valores en negrita en los lotes con enzima son los que más se incrementaron respecto al control.
 Los valores en negrita corresponden a los aminoácidos predominantes.

flora presente que se encargaría de liberar los aminoácidos. Esta hipótesis quizá pueda apoyarse por el curso de los fenómenos proteolíticos que acaecen en un queso en maduración. En este producto la quimosina, aparte de la acción primaria de desestabilización de las caseínas, actúa sobre estas proteínas, de forma particular sobre la α_s -1-caseína, para rendir péptidos de hasta un tamaño molecular de 4.000-6.000 d.; no llega más lejos su acción proteolítica. Después, dichos péptidos son metabolizados por la flora láctica (lactococos y lactobacilos) durante la maduración (Dalglish, 1987; Fox y Law, 1991; Steele y Ünlü, 1992).

Este fenómeno no se había detectado en los experimentos descritos en los capítulos anteriores, dado que en cada uno de ellos se usó la misma enzima pero a diferente dosis. Por tanto, la liberación de aminoácidos se atribuyó a la acción indirecta de la proteinasa. Este fenómeno quizá explique también las diferencias observadas entre los aminoácidos libres de los lotes anteriores y el lote de este apartado correspondiente a la misma enzima. En este aspecto, lo primero que destaca al comparar la tabla III.18 con las tablas III.6, III.10 y III.14 es, para las tres proteinasas, las diferencias tan grandes en el contenido en Glu que, por ejemplo, en el lote con 100 U. de aspartil proteinasa fue de 696 mg/100g E.S. y en el de 6000 U. la tasa de dicho aminoácido fue más de cuatro veces menor. En principio, este resultado parece totalmente ilógico, pero si se tiene en cuenta que proceden de fabricaciones distintas se puede atribuir al glutamato sódico que se añade a la masa que, evidentemente, se va a detectar en la cromatografía HPLC. Se observa también para otros aminoácidos, como His, Ala y Leu, que las tasas fueron mayores en el lote con la menor cantidad de pronasa 300 U. que en los otros dos a los que se añadieron mayores cantidades de la enzima, incluso el que se se fabricó con 6000 U. de pronasa E. Este efecto no sólo se observó con dicha enzima, sino también con las otras dos proteinasas e, igualmente, ocurrió en este control en relación con los de los otros lotes. Parece lógico, pues, no atribuir las elevadas tasas de estos aminoácidos a las proteinasas sino a causas ajenas; de ellas, las más probables, como se ha

indicado anteriormente, pueden estar relacionadas con la actividad aminopeptidásica de la flora microbiana que encuentra un sustrato idóneo para liberar dichos aminoácidos.

En la tabla III.19 se muestran los cambios en las tasas de aminas durante la maduración de los embutidos fabricados con las tres proteinasas a las dosis que se indican. La triptamina, al igual que ocurrió en los otros lotes a los que se añadieron proteinasas (tablas III.7, III.11 y III.15), se mantuvo a niveles muy parecidos durante la maduración o se observó un ligero aumento. Otras aminas (2-feniletilamina, espermina y espermidina) se mantuvieron sin apenas variación a lo largo del proceso madurativo. No se detectó en ninguna muestra cadaverina, como sucedió en los embutidos elaborados con 600 y 6000 U. de pronasa E (tabla III.7) y a diferencia de los lotes elaborados con aspartil proteinasa (tabla III.11) y papaína (tabla III.15), en los que se observó un aumento durante la maduración; estas diferencias entre unos lotes y otros a pesar de que algunos se elaboraron con la misma enzima aunque con diferentes dosis quizás apoyan el poco efecto, si alguno, de la adición de proteinasa en la formación de aminas, y su generación depende directamente de la flora que se implante en cada caso.

Se observa un claro aumento de la putrescina+histamina. Este comportamiento, aunque variaron los valores absolutos, fue el mismo que para los lotes pronasa E-600 U. y 6000 U. (tabla III.7), aspartil proteinasa-800 U. y 4500 U. (tabla III.11) y papaína-800 U. y 4500 U. (tabla III.15). Es difícil saber qué cantidad corresponde a una y otra amina pero sí la de sus precursores. La histidina siempre fue un aminoácido que estuvo presente en cantidades importantes en todos los lotes incluidos los controles, excepto en uno (lote control de los embutidos fabricados con 800 U. y 4500 U. de papaína) y fue precisamente en éste donde se alcanzaron las tasas más bajas de putrescina+histamina. Del mismo modo, la arginina se detectó en diversos lotes [los cuatro cuyos resultados se recogen en este apartado y en los de papaína-800 U. y su control (tabla III.14)] en cantidades muy bajas, muchas veces en niveles "trazas" y no sólo al principio de la maduración sino, a veces, durante todo

TABLE III.19. Cambios en el contenido en aminas (mg/100g E.S.) en los embutidos fabricados con pronasa E, aspartil proteinasa y papaína.

Lote	Control						Pronasa (300 U.)						Aspartil proteinasa (100 U.)						Papaína (500 U.)					
	0	2	5	15	26		0	2	5	15	26		0	2	5	15	26		0	2	5	15	26	
Triptamina	5,5	6,1	5,1	4,9	3,3		5,5	5,9	5,7	7,9	7,8		5,5	4,6	3,7	9,8	9,1		5,5	3	7,1	7,6	7,5	
2-Fenitilamina	ND	Tr	Tr	Tr	1,4		ND	2,7	Tr	2,1	2,6		ND	Tr	Tr	2,3	6,4		ND	Tr	ND	Tr	1,8	
Putrescina + Histamina	ND	25,6	41,4	44,1	76,9		ND	60,7	84,9	141,1	156,1		ND	60,5	108,8	234	241,6		ND	43,6	56	86,9	94,8	
Esperridina	Tr	Tr	2,7	Tr	3,5		Tr	Tr	Tr	3,1	2,9		Tr	Tr	2,9	3	Tr		Tr	2,8	Tr	2,3	Tr	
Esperrina	9,8	Tr	11,9	5,2	14,6		9,8	6,9	11,5	12,1	9,2		9,8	10,6	15,3	9,3	10,6		9,8	12,6	10,5	12,3	7,5	
Tiramina	ND	8,1	9,3	10,2	14,4		ND	17,1	22,7	22,8	17,4		ND	2,5	18,1	19,3	17,8		ND	10,7	14,9	14,4	13	
Cadaverina	ND	ND	ND	ND	ND		ND	ND	ND	ND	ND		ND	ND	ND	ND	ND		ND	ND	ND	ND	ND	

Tr.- trazas; ND.- no detectado

el proceso. Sin embargo, las tasas de putrescina+histamina fueron, en esos lotes, realmente elevadas. Se podría argumentar que se iría produciendo la desimidación de la arginina y posterior transformación en putrescina a medida que se va generando, pero este fenómeno debiera manifestarse también, al mismo ritmo, en los demás lotes de la misma fabricación como en el lote papaína-4500 U. (tabla III.15) y posiblemente también en otros, pero no se observó. Parece, pues, atribuir la tasa hallada de putrescina+histamina mayoritariamente al último aminoácido. No se ha descrito que los lactobacilos aislados de carne envasada a vacío produzcan putrescina o histamina en carne aséptica inoculada con diversas cepas aisladas de aquella fuente (Edwards y col., 1987) pero sí la producción de histamina por ciertas cepas de lactobacilos (Cantoni y col., 1975) y por *Lactobacillus bulgaricus*, obteniéndose la máxima concentración (56 µg/g), en caldo MRS, a pH de 5,5 (Chander y col., 1989). Estas observaciones apoyan la deducción anterior de que la histamina es la amina mayoritaria del pico correspondiente a putrescina+histamina, que no fue posible separar en la cromatografía HPLC.

Finalmente, la tiramina aumentó en todos los lotes recogidos en la tabla III.19 y, por tanto, se comportó del mismo modo que ya se había observado en las fabricaciones descritas en apartados anteriores. En este caso, existen menos dudas de los microorganismos responsables; casi seguro los lactobacilos, como se ha discutido previamente.

III.5.3. Análisis sensorial.

En la prueba triangular no se observaron diferencias significativas entre el control y los embutidos con pronasa y papaína, como sucedió con los lotes que contenían la dosis más baja de dichas enzimas en las experiencias realizadas con anterioridad (véase III.2.3 y III.4.3). De la misma forma, se apreció una diferencia significativa ($p \leq 0,01$) entre el lote control y el que contenía aspartil proteinasa, al igual que había sucedido en los lotes fabricados con dosis mayores de esta proteinasa (véase III.3.4); de nuevo se debió a un

ablandamiento excesivo.

La tabla III.20 muestra los resultados del análisis sensorial (prueba preferencial) de los embutidos fabricados con pronasa E (300 U.), aspartil proteinasa (100 U.) y papaína (500 U.).

Los lotes con pronasa E y papaína obtuvieron puntuaciones bastante semejantes a las del control. El lote con pronasa E fue valorado ligeramente inferior al control, a diferencia de lo que ocurrió en el lote pronasa E-600 U. (véase III.2.3), lo que parece indicar que la cantidad más adecuada para añadir a los embutidos crudos fermentados es cercana a 600 unidades, bien por encima o por debajo de ese valor. En cuanto al lote con papaína, se obtuvo una puntuación similar al lote con pronasa E, ligeramente inferior a la del control pero superior a la del lote papaína-800 U. Por lo tanto se puede decir que, posiblemente, la dosis más adecuada de este enzima está más próxima a las 500 que a las 800 unidades para lograr un efecto beneficioso.

El lote con aspartil proteinasa recibió una puntuación marcadamente inferior a la del control en todas las características organolépticas evaluadas, debido al ablandamiento a que antes se hacía referencia. Sin embargo, aunque se apreciaron puntuaciones semejantes en color+apariencia y en textura a las obtenidas por los otros lotes con aspartil proteinasa (tabla III.12), los resultados obtenidos en la valoración del sabor y aroma fueron inferiores a los de aquellos, especialmente respecto al lote con 4500 unidades. Al parecer, las cantidades elevadas de esta enzima dan lugar a un sabor y aroma favorables, pese a las alteraciones de textura y teniendo siempre en cuenta que los lotes se valoraron respecto a una referencia de embutido crudo curado. Es posible que esta proteinasa pueda ser útil empleándola para aportar, desde el principio, aminoácidos libres, dado que proporciona un sabor aceptable, o bien que pueda usarse en la elaboración de nuevos productos cárnicos, diferentes en su apariencia y textura a los salchichones (estos aspectos se discuten más extensamente en la discusión general).

Tabla III.20. Calidad organoléptica al final de la maduración de los embutidos fabricados con pronasa E, aspartil proteinasa y papaína.

Lote	Unidades añadidas*	Color y Apariencia	Textura	Sabor y Aroma	Calidad global**
Control	0	7,5a	7,1a	7,6a	7,5a
Pronasa-300	300	7,4a	7,0a	7,4a	7,3a
Aspartil-100	100	4,1b	3,2b	4,9b	4,4b
Papaína-500	500	7,2a	6,7a	7,5a	7,3a

a, b: letras diferentes representan diferencias significativas ($p \leq 0,01$).

* Para la definición de unidad, ver apartado II.3.1

** Calidad global = Color y Apariencia x 0,1 + Textura x 0,25 + Sabor y Aroma x 0,65

IV.- DISCUSSION GENERAL

No cabe duda de que la proteólisis es uno de los fenómenos que alcanza mayor relevancia en los productos sometidos a maduración (quesos, embutidos, etc.). La proteólisis provoca una fragmentación parcial de las proteínas musculares, tanto de la miosina como de la actina y troponina T (Garriga y col., 1988; Verplaetse y col., 1989; García de Fernando y Fox, 1991) y probablemente también de las proteínas solubles (Garriga y col., 1988). Como resultado de este ataque primario de las proteínas aumentan todas las fracciones nitrogenadas inferiores, como nitrógeno no proteico, nitrógeno peptídico, nitrógeno amínico y los aminoácidos libres. Así ha sido puesto de manifiesto por numerosos autores (Wardlaw y col., 1973; Reuter y col., 1968; Dierick y col., 1974; Cantoni y col., 1985; Lois y col., 1987; Ferre y Arboix, 1988; Garriga y col., 1988; DeMasi y col., 1990, etc.). Los péptidos de pequeño tamaño molecular y los aminoácidos pueden, por sí mismos, contribuir al sabor del producto final o sufrir transformaciones posteriores, como descarboxilaciones, desaminaciones y transaminaciones merced a la actividad de la flora microbiana presente para rendir sustancias volátiles (ácidos orgánicos, aldehídos, nitrógeno básico volátil, etc) o no (otros aminoácidos y aminas no volátiles). Todos estos fenómenos afectan tanto a la textura (se produce una progresiva solubilización) como al sabor y aroma.

Ante estos acontecimientos, es razonable plantear la hipótesis que al añadir intencionadamente proteinasas a los embutidos se podrían catalizar las reacciones proteolíticas y, en consecuencia, lograr una potenciación del sabor y del aroma, lo que podría conllevar un acortamiento del proceso madurativo. Basándose en esta hipótesis, se ha investigado el efecto de la adición de tres proteinasas (pronasa E de *Streptomyces griseus*, aspartil proteinasa de *Aspergillus oryzae* y papaína de *Carica papaya*) en las degradaciones de las proteínas.

Los resultados obtenidos han mostrado que, efectivamente, la adición de las proteinasas ocasionó un aumento considerable de todas las fracciones nitrogenadas antes mencionadas y que se producía, en términos generales, durante la fase fermentativa fundamentalmente. En este sentido, no cabe duda de que se logra un acortamiento de la

maduración, ya que en esos pocos días se consigue, con las tres enzimas y con todas las dosis empleadas, unos niveles de las distintas fracciones nitrogenadas superiores a las que se logran al final de la maduración en los embutidos utilizados como control. Similares resultados se han obtenido para los quesos, como en el Cheddar, en el que se ha descrito un porcentaje de aceleración de la maduración de 25-66% al añadir una proteinasa neutra de *Aspergillus oryzae* y utilizando la evaluación de aminoácidos como índice de maduración (Fedrick y col., 1986) o en el queso Gouda, en el que se obtuvieron porcentajes de aceleración del 10-24% con proteinasas de distintos microorganismos (*Bacillus subtilis*, *Aspergillus melleus*, *Streptomyces* sp y *Aspergillus oryzae*) utilizando como índices las fracciones nitrógeno soluble en agua, nitrógeno soluble en ácido tricloroacético y nitrógeno aminoacídico (Kataoka y col., 1987).

Muy distintos son los resultados que se han obtenido en el análisis sensorial. El incremento de las fracciones nitrogenadas no se traduce en una mejora ostensible de la calidad organoléptica global; sólo en un caso, cuando se añadieron 600 U. de pronasa E, se obtuvieron embutidos que organolépticamente superaron la puntuación de los controles y aún así no se obtuvieron diferencias significativas. En otros casos también se lograron puntuaciones próximas a la de los embutidos controles (lote de pronasa E-300 U. y lote papaína-500 U.) en el análisis sensorial. Sin embargo, es necesario indicar que a veces, sobre todo cuando se añadió la aspartil proteinasa de *Aspergillus oryzae* a cualquiera de las dosis ensayadas (100, 800 y 4500 unidades) la calidad organoléptica global fue muy deficiente, derivada de un ablandamiento excesivo de la masa, sin duda debido a la profunda proteólisis que se originó. Estos resultados coinciden parcialmente con los hallados en quesos en los que también se ha observado una consistencia más blanda (Fedrick y col., 1986; Hayashi y col., 1990) junto con otros defectos como textura quebradiza (Fedrick y col., 1986) y sabores amargos (Law y Wigmore, 1982; Alkhalof y col., 1987; Ardö y Petterson, 1988), el último posiblemente debido a la acumulación de péptidos hidrófobos

derivados de la β -caseína (Lemieux y Simond, 1992). No obstante, en algunos casos, como con la proteinasa neutra de *Bacillus subtilis*, se ha podido incrementar el sabor típico del queso sin que aparezca el amargor mediante un ajuste cuidadoso de la dosis de enzima (Law y Wigmore, 1982) por lo que, en opinión de Law (1984a) es necesario, en el caso del queso, elegir cuidadosamente la enzima y la dosis a añadir si no se quiere obtener un sabor y aroma desequilibrado y la aparición de sabores amargos.

A pesar de todos estos problemas, otros autores (Frey y col., 1986; Núñez y col., 1991) han tenido más éxito y opinan que la adición de proteinasas es un método útil para acortar el período madurativo del queso sin que se originen defectos en el sabor y aroma, de forma particular en quesos elaborados con leche de oveja (Núñez y col., 1991), cuyas caseínas son menos susceptibles de originar sabores amargos (Pelissier y Manchon, 1976).

En cualquier caso, en una reciente revisión sobre el tema (El Soda y Pandian, 1991) se concluye que aún se están llevando a cabo investigaciones acerca de la adición directa a la leche de enzimas individuales o una mezcla de enzimas para acelerar la maduración, a pesar de que se sabe que dicha adición conduce con frecuencia a una disminución del rendimiento y que se pierde más del 80% de la enzima en el momento del desuerado (Kirby y col., 1987). Sin embargo, la adición de la enzima a la cuajada puede realizarse con un éxito relativo en el caso del queso Cheddar, donde la proteinasa se mezcla con la sal, lo que no puede realizarse en otras variedades dado que las piezas de queso se salan por inmersión en salmuera.

Sin lugar a dudas, las desventajas citadas anteriormente de disminución del rendimiento y la pérdida de enzima no se van a producir en el caso de los embutidos, ya que todos los ingredientes añadidos a la mezcla se embuten conjuntamente y además no se han detectado sabores amargos. No obstante, como se ha demostrado en este trabajo, los resultados no han sido tan satisfactorios como cabría esperar. Ya se ha comentado que se aceleró la proteólisis incluso hasta el nivel de aminoácidos, pero no se reflejó positivamente en la evaluación sensorial. Ante estos resultados cabe hacer el siguiente razonamiento: los

aminoácidos libres contribuyen al sabor de un determinado alimento, aunque su grado de influencia ha sido discutido por diversos autores (Bains y Mlot kiewicz, 1984; Nishimura y Kato, 1988; Kato y col., 1989). Ya en la década de los 60 (Kiely y col., 1960; Johnson y col., 1966) se había asociado cada aminoácido con un sabor determinado (por ejemplo alanina a nuez, prolina a pastas, arginina a "palomitas de maíz", leucina, arginina e histidina a pan, fenilalanina a caramelo, etc.) pero mezclados o junto a nucleótidos puede modificarse el sabor de forma marcada (Yamaguchi, 1967; Nishimura y Kato, 1988; Cambero y col., 1992). Sin embargo, en el caso de los embutidos parece que el efecto de los aminoácidos libres en el sabor no parece adquirir una gran relevancia, dado que cuando en los embutidos se consiguieron tasas elevadas de ellos no condujo a un cambio manifiesto en el sabor. Es posible que quede solapado por otros ingredientes, como las especias. Por ello, quizás sean más importantes las transformaciones que pueden sufrir los aminoácidos, las cuales dependen de la actividad de la flora microbiana presente (Vandekerckhove, 1977) a través de descarboxilaciones o desaminaciones, o también merced a reacciones químicas como la degradación de Strecker, que rinde aldehídos, amoníaco y otras sustancias (Davídek y col., 1990), pudiendo verse facilitada por una cantidad considerable de aminoácidos libres originados por una proteólisis intensa unido a una baja actividad de agua (Barbieri y col., 1992). Así, la presencia de algunos aldehídos de cadena ramificada en jamones curados, como el 2 y el 3-metilbutanal, ha sido atribuida a la degradación de Strecker (García y col., 1991; Barbieri y col., 1992), pudiendo influir poderosamente en el sabor y aroma de dichos productos (Ventanas y col., 1992).

En los embutidos elaborados con las tres proteinasas coexisten dichos sustratos (una gran cantidad de aminoácidos libres), agentes (una elevada tasa de microorganismos, tanto internamente, flora láctica y otras bacterias, como superficialmente, flora fúngica) y factores (reducida actividad de agua) pero, sin embargo, no se generaron la suficiente cantidad de sustancias aromáticas y sápidas para potenciar el sabor y aroma del producto final, dado que

no se reflejó en el análisis sensorial. ¿Qué puede, pues, haber ocurrido?. No es fácil contestar a esta pregunta y la única respuesta que se ha hallado está relacionada con el tiempo de maduración. Aunque las condiciones para que se produzcan estas reacciones sean favorables es posible que no se puedan acelerar, ya que, por una parte, la tasa de bacterias está estabilizada desde que concluye la fermentación y, por otra, la temperatura de maduración es baja para que las reacciones químicas (la degradación de Strecker es un fenómeno temperatura dependiente) se produzcan con rapidez. De hecho, en el caso del jamón curado los tiempos de maduración son muy largos (más de 12 meses). Así pues, hay que deducir que, aunque se acelere la proteólisis, no parece posible acortar de forma significativa la maduración de los embutidos mediante la adición de proteinasas. Quizás el empleo de períodos madurativos más largos que los utilizados en el presente trabajo (26 días como máximo) permita obtener diferencias más marcadas en lo referente al sabor y aroma entre embutidos elaborados con proteinasas y sin ellas. Es posible también que otras proteinasas, tanto microbianas como de otro origen, proporcionen resultados más destacados. Puede, por otra parte, que manipulando las condiciones de maduración, sobre todo las referentes a la temperatura, ocasione efectos más positivos. Estas consideraciones son simplemente especulativas, pero pueden servir de punto de partida para ampliar los estudios descritos en esta memoria.

No obstante, cabe también otra posibilidad que merece la pena destacar separadamente. Se ha dicho anteriormente que la flora se estabiliza transcurridas las primeras 24-48 horas. Es justamente en este período cuando se produce el incremento explosivo de la microflora y es también en este tiempo cuando la temperatura alcanza los valores más elevados (22-25°C). Por ello, se ha pensado que si los microorganismos dispusieran desde el principio de un gran suministro de aminoácidos libres pudieran descarboxilarlos y desaminarlos masivamente durante su multiplicación explosiva, e incluso pudiera participar en estos fenómenos, además de la flora láctica, las micrococáceas, dado que éstas ya no

pueden hacerlo más tarde debido a su descenso progresivo tras la fase fermentativa (Selgas y col., 1988). Se formarían así sustancias derivadas de los aminoácidos que se acumularían o estarían expuestas a otras reacciones, como las oxidativas. Si estos acontecimientos ocurrieran así, es posible que se pudiera potenciar el sabor y aroma. El suministro de aminoácidos libres se haría fácilmente mezclando con la masa original una "papilla" preparada previamente mediante la adición de la proteinasa más adecuada; en otras palabras, los embutidos finales obtenidos de la forma que se ha descrito en esta memoria se podrían utilizar como un ingrediente más que se añadiría en el momento de la fabricación de un lote de embutidos. Es una investigación abierta que la autora desea llevar a cabo en el futuro.

V.- CONCLUSIONES

1. La adición de pronasa E de *Streptomyces griseus*, aspartil proteinasa de *Aspergillus oryzae* y papaína de *Carica papaya* a embutidos crudos fermentados origina, incluso en pequeñas cantidades, un incremento considerable de la proteólisis, que conduce a un aumento de todas las fracciones nitrogenadas. De las tres enzimas, la aspartil proteinasa de *A. oryzae* es la que provoca una mayor aceleración de la proteólisis, incluso a dosis pequeñas.

2. El incremento de la proteólisis se produce, en todos los casos, durante la fase de fermentación del embutido. Tras este período, los fenómenos degradativos no progresan significativamente, por lo que el riesgo de una excesiva proteólisis que desencadene la sobremaduración del producto es mínimo.

3. La adición de cualquiera de las tres proteasas en dosis elevadas provoca un ablandamiento excesivo de la masa del embutido, por lo que el empleo de cualquiera de estas enzimas, y probablemente el de otras, requiere un ajuste cuidadoso de la dosis.

4. El incremento de la proteólisis no se traduce en una aceleración de la maduración, dado que en el análisis sensorial no se refleja una potenciación del sabor y aroma de los embutidos ni una mejora apreciable de la calidad organoléptica global. No obstante, los embutidos elaborados con 600 U. de pronasa E presentan mejores características sensoriales aunque sin diferencias estadísticamente significativas respecto al control.

5. La elaboración de diversos lotes de embutidos con cada una de las proteasas empleando la misma materia prima e iguales condiciones de maduración origina una liberación similar de la mayoría de los aminoácidos. Se deduce, pues, que posiblemente la flora microbiana de los embutidos es la principal responsable de la liberación de los mismos a partir de los péptidos generados por las proteasas.

6. Desde el punto de vista sanitario, y a pesar de que se produce un aumento del contenido en aminos biógenas, la concentración de estas sustancias no es peligrosa para potenciales consumidores incluso los más susceptibles, a no ser que la dosis de proteasa sea muy elevada, lo que los análisis sensoriales desaconsejan debido al ablandamiento excesivo de la masa.

7. De forma hipotética se ha concluido, a la vista de la falta de potenciación del sabor y aroma al añadir enzimas proteolíticas, que la transformación de aminoácidos libres en sustancias aromáticas y sápidas puede ocurrir de forma acusada en la fase de crecimiento logarítmico de la flora, durante la fermentación. En consecuencia, se ha abierto una nueva posibilidad que sería interesante explorar: la utilización de embutidos previamente hidrolizados mediante proteinasas como ingredientes de la masa original; con ello, se inocularía el cultivo iniciador y se suministraría una elevada tasa de aminoácidos libres dispuestos para ser transformados durante el crecimiento explosivo de la flora.

VI.- BIBLIOGRAFIA

- ABO-ELNAGA, I.G. y PLAPP, R. (1987). *J. Basic Microbiol.*, **27**, 123.
- ABRANOWITZ, N., SCHECHTER, I., BERGER, A. (1967). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **29**, 862.
- ACTON, J.C. (1978). *Proc. 20th Annual Meat Science Institute*. University of Georgia, p. 13.
- ACTON, J.C. y DICK, R.L. (1976). *J. Food Sci.*, **41**, 971.
- ALFORD, J.A., SMITH, J.L. y LILLY, H.D. (1971). *J. Appl. Bact.*, **34**, 133.
- ALI, L.A.M. (1960). *Mededel Landhouwhogeschool Wageningen*, **60**, 1.
- ALKHALAF, W., VASSAL, L., DESMAZEAUD, M.J., GRIPON, J.C. y PERROT, E. (1987). *Le Lait*, **67**, 173.
- AMERINE, M.A., PANGBORN, R.M. y ROESSLER, E.B. (1965). En *Principles of sensory evaluation of food*. Academic Press. Nueva York y Londres.
- ANONIMO (1977). *Dairy and Ice Cream Field*, **160**, 66k.
- ARDÖ, Y. y PETERSON, H.E. (1988). *J. Dairy Res.*, **55**, 239.
- ASGHAR, A. y BHATTI, A.R. (1987). Endogenous proteolytic enzymes in skeletal muscle: their significance in muscle physiology and during postmortem aging events in carcasses. En *Advances in food research*. C.O. Chichester, E.M. Mrak y B.S. Schweigert (eds.). Academic Press. San Diego.
- ASHOUR, M.M., ABDEL-BAKY, A.A. y EL-NESHAWY, A.A. (1986). *Food Chem.*, **20**, 85.
- ASTIASARAN, I., SANTAMARIA, I., VILLANUEVA, R. y BELLO, J. (1990a). *Rev.*

Agroquim. Tecnol. Aliment., 30, 211.

ASTIASARAN, I., VILLANUEVA, R. y BELLO, J. (1990b). **Meat Sci., 28, 111.**

ASTIASARAN, I., LIZARRAGA, T., MELGAR, J., SANTAMARIA, I., VILLANUEVA, R. y BELLO, J. (1990c). **Alimentaria, 209, 57.**

ATLAN, D., LALOI, P. y PORTALIER, R. (1989). **Appl. Environ. Microbiol., 55, 1717.**

ATLAN, D., LALOI, P. y PORTALIER, R. (1990). **Appl. Environ. Microbiol., 56, 2174.**

AYROULET, M., FOURNAUD, J. (1976). **Fleischwirtsch., 53, 1331.**

BAANKREIS, R. y EXTERKATE, F.A. (1991). **System. Appl. Microbiol., 14, 317.**

BACUS, J. (1984). Meat cultures. En *Utilization of microorganisms in meat processing: a handbook for meat plant operators*. J. Wiley & sons Inc. New York.

BACUS, J. (1986). Fermented meat and poultry products. En *Advances in meat and poultry microbiology*. A.M. Pearson y T.R. Dutson (eds.). Mac Millan. London.

BAEZA, G., CORREA, D. y SALAS, C. (1990). **J. Sci. Food Agric., 51, 1.**

BAILEY, M.E. y SWAIN, J.W. (1973). **Proc. Meat Ind. Res. Conf.** American Meat Institute Foundation. Chicago, p. 29.

BAINES, D.A. y MLOTIKIEWICZ, J.A. (1984). The chemistry of meat flavor. En *Recent advances in the chemistry of meat*. H.J. Baily (ed.). Royal Soc. Chemistry.

- BALDINI, P., BERNARDI, E.P. y RACZYNSKY, R. (1977). *Ind. Conserve*, **52**, 16.
- BANDEIRA DE OLIVEIRA, C., LEON CRESPO, F., PENEDO, J.C., GALAN, H., PERALTA, M.A. y CIUDAD, N. (1992). *Alimentaria*, **229**, 27.
- BARBIERI, G., BOLZONI, L., PAROLARI, G., VIRGILI, R., BUTTINI, R., CARERI, M. y MANGIA, A. (1992). *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 2389.
- BARBUT, S., JOSEPHSON, D.B. y MAURER, A.J. (1985). *J. Food Sci.*, **50**, 1356.
- BARRANCO, A., LEON CRESPO, F., PENEDO, J.C., BELTRAN, F., MATA, C., MONTERO, E. y MARTINS, C. (1985). *Alimentaria*, **165**, 35.
- BARRETT, A.J. y KIRSCHKE, H. (1981). Cathepsin B, cathepsin H and cathepsin L. En *Methods in Enzymology*. Vol. 80. Academic Press.
- BARRETT, A.J. y MC DONALD, J.K. (1980). En *Mammalian proteases. A glossary and bibliography*. Vol. 1. Academic Press. Londres.
- BARRETT, F.F. (1975). Enzymes uses in milling and baking industries. En *Enzymes in Food Processing*. G. Reed (ed.). Academic Press. Nueva York.
- BARTELS, H.J., JOHNSON, M.E. y OLSON, N.F. (1985). 18th Ann. Meet., *J. Dairy Sci.*, **68**, 69.
- BASS, E.J. y CAYLE, T. (1975). Beer. En *Enzymes in food processing*. G. Reed (ed.). Academic Press. Nueva York.
- BAUMGARTNER, P.A., KLETTNER, P.G. y RÖDEL, W. (1980). *Meat Sci.*, **4**, 191.
- BEAVER, R.W., WILSON, D.M., JONES, H.M. y HAYDON, K.D. (1987). *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**, 425.
- BECZE, G.I. (1970). *CRC Critical Reviews in Food Technology*, **1**, 479.

- BELITZ, H.-D. y GROSCH, W. (1988). En *Química de los alimentos*. Ed. Acribia. Zaragoza.
- BERDAGUE, J.L., MONTEL, M.C., TALON, R. y MONTEIL, P. (1992). **Proc. 38th Int. Con. Meat Sci. Technol.** Clermont-Ferrand. Vol. 4, 771.
- BERDAGUE, J.L., MONTEIL, P., MONTEL, M.C. y TALON, R. (1993). **Meat Sci.**, **35**, 275.
- BERGMAN, M. (1942). **Advan. Enzymol.**, **2**, 49.
- BERIAIN, M.J., SANTAMARIA, I. y BELLO, J. (1990). **Alimentaria**, **209**, 63.
- BERNHOLDT, H.F. (1975). Meat and other proteinaceous foods. En *Enzymes in food processing*. G. Reed (ed.). Academic Press. Nueva York.
- BEUCHAT, L.R. (1976). **J. Food Sci.**, **41**, 899.
- BHOWMIK, T. y MARTH, E.H. (1989). **J. Dairy Sci.** **72**, 2869.
- BIGELIS, R. (1992). **Food Technol.**, **46**, 151.
- BIRD, J.W.C. y CARTER, J. (1980). Proteolytic enzymes in striated and nonstriated muscle. En *Degradative processes in heart and skeletal muscles*. K. Widenthal (ed.). Elsevier Appl. Sci. Nueva York.
- BLACKWELL, B. y MABBITT, L.A. (1965). **Lancet**, 938.
- BOCKLEMAN, I. y LODIN, L.O. (1974). **Proc. XIXth Int. Dairy Con.** Nueva Delhi, 1E, 441.
- BOCKELMANN, W., FOBKER, M. y TEUBER, M. (1991). **Int. Dairy J.**, **1**, 51.

- BOCKELMANN, W., SCHULTZ, Y. y TEUBER, M. (1992). *Int. Dairy J.*, **2**, 95.
- BOSMAN, B. W., TAN, P.S.T. y KONINGS, W.N. (1990). *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1839.
- BOTAZZI, U. (1965). *Scienza e Technica Lattiero-casearia*, **16**, 229.
- BOUDREAU, J.C., OORAVEC, J., HOANG, N.K. y WHITE, T.D. (1979). *ACS Symp. Series*, **115**, 1.
- BROOKS, J., HAINES, R.B., MORAN, T. y PACE, J. (1940). *Food Invest. Special Report*, **49**, Londres.
- BROWN, C.L., HEDRICK, H.B. y BAILEY, M.E. (1974). *J. Food Sci.*, **39**, 977.
- BURGOS, J. (1981). *Filon*, diciembre 1981, 16.
- CAMBERO, M.I., SEUSS, I. y HONIKEL, K.O. (1992). *J. Food Sci.*, **57**, 1285.
- CANTONI, C., BIANCHI, M.A. y BERETTA, G. (1974). *Ind. Aliment.*, **108**, 75.
- CANTONI, C., D'AUBERT, S., BIANCHI, M.A. y BERETTA, G. (1975). *Ind. Aliment.*, **113**, 88.
- CANTONI, C., D'AUBERT, S. y BRESCLANI, C.M. (1985). *Scienze*, **10**, 87.
- CANTONI, C., MOLNAR, M.R., RENON, P. y GIOLITTI, G. (1967). *Die Narung*, **11**, 341.
- CASSENS, R.G., GREASER, M.L., ITO, T. y LEE, M. (1979). *Food Technol.*, **33**, 46.
- CENZANO, I. (1991). *Cárnica 2000*, **96**, 49.

- CERISE, L., BRACCO, U., HORMAN, I., SOZZI, T. y WUHRMANN, J.J. (1972). **Proc. 18th Ann. Meet. Eur. Meat Res. Work. Guelph**, p. 382.
- CERISE, L., BRACCO, U., HORMAN, I., SOZZI, T. y WUHRMANN, J.J. (1973). **Fleischwirtsch.**, **53**, 223.
- CID, C., ASTIASARAN, I. y BELLO, J. (1992a). **Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.**, **32**, 59.
- CID, C., IRIARTE, J., ASTIASARAN, I. y BELLO, J. (1992b). **Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.**, **32**, 307.
- CLEGG, K.M., LIM, L.L. y MANSON, W. (1974). **J. Dairy Res.**, **41**, 283.
- CODIGO ALIMENTARIO ESPAÑOL (1967). Imprenta Nacional del Boletín Oficial del Estado. Madrid.
- COLONNA, P. y ADDA, J. (1976). **Le Lait**, **56**, 143.
- COMI, G. y CANTONI, C. (1980). **Ind. Aliment.**, **19**, 857.
- COMI, G. y CANTONI, C. (1983). **Ind Aliment.**, **22**, 102.
- COMI, G., CITTERIO, B., MANZANO, M., CANTONI, C. y BERTOLDI, M. (1992). **Fleischwirtsch.**, **72**, 1679.
- CORDOBA, J.J. (1990). Transformaciones de los componentes nitrogenados durante la maduración del jamón de cerdo ibérico. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura.
- CORETTI, K. (1958). **Die Fleischwirtsch.**, **3**, 218.
- CROSS, C.K. y ZIEGLER, P. (1965). **J. Food Sci.**, **30**, 610.

- CHANDER, H., BATISH, V.K., BABU, S. y SINGH, R.S. (1989). *J. Food Sci.*, **54**, 940.
- CHEN, C.C. (1982). M.S. Thesis. Michigan State University. U.S.A.
- CHO, I.C. y BRATZLER, L.J. (1970). *J. Food Sci.*, **35**, 668.
- DAESCHEL, M.A. (1989). *Food Technol.*, **43**, 164.
- DAINTY, R.H., EDWARDS, R.A., HIBBARD, C.M. y RAMANTANIS, S.V. (1986). *J. Appl. Bacteriol.*, **61**, 117.
- DAINTY, R.H., SHAW, B.G., HARDING, C.D. y MICHAINED, S. (1979). The spoilage of vacuum-packed beef by cold tolerant bacteria. En *Cold Tolerant Microbes in Spoilage and the Environment*. A.D. Russel y R. Fuller (eds.). Academic Press. Londres.
- DALGLEISH, D.G. (1987). En *Cheese: Chemistry, Physic and Microbiology*. Vol. 1. P.F. Fox (ed.). Elsevier Applied Science Pub. Nueva York.
- DAVIDEK, J., VELISEK, J. y POKORNY, J. (1990). En *Chemical changes during food processing*. Developments in food science 21. Elsevier Applied Science Pub. Amsterdam.
- DAVIS, B.D. (1978). Fisiología bacteriana. En *Tratado de microbiología*. 2ª ed. Salvat Editores. Barcelona.
- DAYTON, W.R., SCHOLLMAYER, J.V., LEPLEY, R.A. y CORTES, L.R. (1981). *Biochem. Biophys. Acta*, **659**, 48.
- DEBEVERE, J.J., VOETS, J.P., De SCHIVER, F. y HUYGHEBART, A. (1976). *Lebensan. w. n. Technol.*, **9**, 160.
- DEIBEL, R.H. (1974). *Proc. Meat Ind. Res. Conf. AMIF*, 57.

- DeKETELEARE, A., DEMEYER, D., VANDEKERCKHOVE, P. y VERVAECKE, I. (1974). *J. Food Sci.*, **39**, 297.
- DEMASI, T.W., GRIMES, L.W., DICK, R.L. y ACTON, J.C. (1989). *J. Food Protec.*, **52**, 189.
- DEMASI, T.W., WARDLAW, F.B., DICK, R.L. y ACTON, J.C. (1990). *Meat Sci.*, **27**, 1
- DEMEYER, D.I., CLAEYS, E., ÖTLES, S., CARON, L. y VERPLAETSE, A. (1992). *Proc. 38th Int. Cong. Meat Sci. Technol. Clermont-Ferrand. Vol. 4*, 775.
- DEMEYER, D.I., HOOZE, J. y MESOM, H. (1974). *J. Food Sci.*, **39**, 293.
- DEMEYER, D.I., VANDEKERCKHOVE, P. y MOERMANS, R. (1979). *Meat Sci.*, **3**, 161.
- DEMEYER, D.I., VERPLAETSE, A. y GISTELINCK, M. (1986). *Proc 32nd Europ. Meet. Meat Res. Work. Gante. Vol. I*, 241.
- DE PABLO, B., ASENSIO, M.A., SANZ, B. y ORDOÑEZ, J.A. (1989). *J. Appl. Bacteriol*, **66**, 185.
- DESMAZEAUD, M. y HERMIER, J. (1968). *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.*, **8**, 565.
- DIERICK, N., VANDEKERCKHOVE, P. y DEMEYER, D. (1974). *J. Food Sci.*, **39**, 301.
- DIXON, M. y WEBB, E.C. (1979). *En Enzymes*. Longmann Group Limited. Londres.
- DOMINGUEZ, M.C. (1988). Evolución de determinados parámetros proteolíticos y

lipolíticos durante la maduración del chorizo elaborado en la provincia de León. Aportaciones a su caracterización. Tesis doctoral. Universidad de León.

DOMINGUEZ, M.C., FERRE, C. y ZUMALACARREGUI, J.M. (1988). *Alimentaria*, **198**, 19.

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

DOMINGUEZ, M.C., MATEO, J., AGUIRREZABAL, M.M. y ZUMALACARREGUI, J.M. (1989b). *Ann. Fac. Vet. Leon*, **35**, 79.

DO NGOC, M., LENOIR, J. y CHOISY, C. (1971). *Rev. Lait Francaise*, **288**, 447.

DONHAM, M.C., HEATH, H.E., LEBLANC, P.A. y SLOAN, G.L. (1988). *J. General Microbiol.*, **134**, 2615.

DRANSFIELD, E. (1993). *Meat Sci.*, **34**, 217.

DRANSFIELD, E. y ETHERINGTON, D.J. (1981). En *Enzymes and food processing*. G.G. Birch, N. Blakebragh y K.L. Parker (eds.). Elsevier Appl. Sci. Londres.

DUBOIS, P., DEGRAND, G., FIEVEZ, L. y GRANVILLE, A. (1973). *Ann. Méd. Vet.*, **117**, 417.

DUCASTELLE, A. y LENOIR, J. (1969). *Le Lait*, **489-90**, 615.

DUNN, B.M. (1989). Determination of protease mechanism. En *Proteolytic enzymes. A practical approach*. R.J. Beynon y J.S. Bond (eds.). IRL Press, Oxford University Press.

EDWARDS, R.A., DAINTY, R.H. y HIBBARD, C.M. (1983). *J. Food Technol.*, **18**, 777.

- EDWARDS, R.A., DAINTY, R.H. y HIBBARD, C.M. (1985). *J. Appl. Bacteriol.*, **58**, 13.
- EDWARDS, R.A., DAINTY, R.H., HIBBARD, C.M. y RAMANTANIS, S.V. (1987). *J. Appl. Bacteriol.*, **63**, 427.
- EILBERG, B.L. y LIEPE, H.-U. (1977). *Die Fleischwirtsch.*, **57**, 1678.
- EITEMILLER, R.R., KOEHLER, P.E. y REAGAN, J.O. (1978). *J. Food Sci.*, **43**, 689.
- EL ABOUDI, M., EL SODA, M., PANDIAN, S., SINARD, R.E. y OLSON, N. (1992). *Int. J. Food Microbiol.*, **15**, 87.
- EL ABOUDI, M., TREPANIER, G., PANDIAN, S. y SIMARD, R.E. (1990). *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, **22**, 407.
- EL SODA, M. (1986). *J. Food Protec.*, **49**, 395.
- EL SODA, M., EZZAT, N., EL DEEB, S., MASHABY, R.I. y MOUSTAPHA, F. (1986). *Le Lait*, **66**, 177.
- EL SODA, M. y PANDIAN, S. (1991). *J. Dairy Sci.*, **74**, 2317.
- EL SODA, M., PANNELL, L. y OLSON, N. (1989). *J. Microencapsulation*, **6**, 319.
- ERICHSEN, I. (1983). *Food Microbiol. Soc. Appl. Bact.* pp. 271.
- ESKELAND, B. y NORDAL, J. (1980). *J. Food Sci.*, **45**, 1153.
- ETHERINGTON, D.J. (1984). *J. Anim. Sci.*, **59**, 1644.

- EXTERKATE, F.A. (1975). *Neth. Milk Dairy J.*, **29**, 303.
- EXTERKATE, F.A. (1979). *Arch. Microbiol.*, **120**, 247.
- EXTERKATE, F.A. y De VEER, J.C.M. (1987). *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 577.
- EZZAT, N., ZEVACO, C., EL SODA, M. y GRIPON, J.C. (1987). *Milchwissenschaft*, **42**, 95.
- FARAG, R.S., DAW, Z.Y., HEWEDI, F.M. y EL-BAROTY, G.S.A. (1989). *J. Food Protec.*, **52**, 665.
- FARM, D.H. y GREEN, J.P. (1965). *J. Biol. Chem.*, **240**, 20.
- FEDERICI, F. (1981). *Ind. Aliment.*, **20**, 679.
- FEDRICK, I.A., ASTON, J.W., NOTTINGHAM, S.M. y DULLEY, J.R. (1986). *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*, **21**, 9.
- FERNANDEZ, E. (1986). *Alimentación. Equipos y tecnología*, Julio-Agosto, 53.
- FERRER, J. y ARBOIX, P. (1986a). *Proc. 32th Eur. Meet. Meat Res. Work. Gante*, vol. II, 277.
- FERRER, J. y ARBOIX, P. (1986b). *Proc. 32th Eur. Meet. Meat Res. Work. Gante*, vol. II, 279.
- FINK-GREMMELES, J., EL-BANNA, A.A. y LEISTNER, L. (1989). *Fleischwirtsch. español*, **2/89**, 38.
- FISCHER, U. y SCHLEIFER, K.H. (1980). *Fleischwirtsch.*, **60**, 1046.
- FOOLADI, M.H., PEARSON, A.M., COLEMAN, T.-H. y MERKEL, R.A. (1979). *Food*

Chem., 4, 283.

FOX, P.F. (1980). **J. Soc. Dairy Technol., 33, 118.**

FOX, P.F. (1982). **Biochem. Soc. Trans., 10, 282.**

FOX, P.F. y LAW, J. (1991). **Food Biotechnol., 5, 239.**

FREY, J.P., JOHNSON, M.E. y MARTH, E.H. (1986). **Milchwissenschaft, 41, 488.**

FROELICH, D.A., GULLETT, E.A. y USBORNE, W.R. (1983). **J. Food Sci., 48, 152.**

GARCIA, C., BERDAGUE, J.L., ANTEQUERA, T., LOPEZ-BOTE, C., CORDOBA, J.J. y VENTANAS, J. (1991). **Food Chem., 41, 23.**

GARCIA, M.L., SELGAS, M.D., FERNANDES, M. Y ORDOÑEZ, J.A. (1992). **Int. J. Food Sci. Technol., 27, 675.**

GARCIA DE FERNANDO, G.D. (1987). Actividad proteolítica exocelular de *Streptococcus faecalis* var *liquefaciens* y su posible aplicación en la fabricación de queso. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

GARCIA DE FERNANDO, G.D. y FOX, P.F. (1991). **Meat Sci., 30, 367.**

GARRIGA, M., CALSINA, M.D. y MONFORT, J.M. (1986). **Proc. 32th Eur. Meet. Meat Res. Work. Gante.**

GARRIGA, M., CALSINA, M.D. y MONFORT, J.M. (1988). **Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim., 3,17.**

GATFIELD, I.L. (1988). **Food Technol., 42, 110.**

- GEISEN, R., LÜCKE, F.-K. y KRÖCKEL, L. (1992). **Fleischwirtsch.**, 72, 894.
- GENIGEORGIS, C. (1978). **Proc. Meat Proces. Conf.** Universidad de California, Davis. p. 21.
- GILBERG, A. (1993). **Process. Biochem.**, 28, 1.
- GILL, C.O. (1982). Microbial interactions with meats. En *Meat Microbiology*. M.H. Brown (ed.). Applied Science Publishers. Londres.
- GIOLITTI, G. (1960). **Arch. Vet. Ital.**, 11, 23.
- GIOLITTI, G. y MASSACRA, G. (1963). **Atti della Soc. Italiana delle Scienze Veter.**, 17, 541.
- GIRARD, J.P. (1991). En *Tecnología de la carne y de los productos cárnicos. VI. El ahumado*. J.P. Girard (coordinador). Ed. Acribia. Zaragoza.
- GIRARD, J.P. y BUCCHARLES, C. (1991). En *Tecnología de la carne y de los productos cárnicos. V. La acidificación*. J.P. Girard (coordinador). Ed. Acribia. Zaragoza.
- GÖKALP, H.Y. (1986). **Fleischwirtsch.**, 66, 573.
- GÖKALP, H.Y. y OCKERMAN, H.W. (1985). **Fleischwirtsch.**, 65, 1235.
- GOLL, D.E., OTSUKA, Y., NAGAINIS, P.A., SHANNON, J.D., SATHE, S.K. y MUGURUMA, M. (1983). **J. Food Biochem.**, 7, 137.
- GOODA, E., BEDNARSKI, W. y POZNAŃSKI, S. (1983). **Milchwissenschaft**, 38, 83.
- GOSSLING, U. (1990). **Lebensmitteltechnik**, 22, 150.

- GOUTENFONGEA, R. (1991). En *Tecnología de la carne y de los productos cárnicos. IV. La salazón*. J.P. Girard (coordinador). Ed. Acribia. Zaragoza.
- GRAY, J.I. y PEARSON, A.M. (1984). *Adv. Food Res.*, **29**, 2.
- GRAY, J.I. y PEARSON, A.M. (1987). Rancidity and warmed-over flavor. En *Advances in meat research. Vol.3. Reestructured meat and poultry products*. A.M. Pearson y T.R. Dutson (eds.). Van Nostrand Reinhold Co. New York.
- GREENE, B.E. y PRICE, L.B. (1975). *J. Agric. Food Chem.*, **23**, 164.
- GRIEVE, P.A. (1982). *Proc. XXI Int. Dairy Con.*, vol. 1, libro 2. Mir Publishers. Moscú.
- GRIEVE, P.A., KITCHEN, B.J. y DULLEY, J.R. (1983). *J. Dairy Res.*, **50**, 469.
- GRIPON, J.C., LE BANS, D. y VASAL, L. (1982). *Proc. XXI Int. Dairy Con.*, vol. 1, libro 1, 486. Mir Publishers. Moscú.
- GUO, S.-L. y CHEN, M.-T. (1991). *Fleischwirtsch.*, **71**, 1425.
- HAARD, N.P. y PATEL, T.R. (1987). Bacterial enzyme used as cheese ripening aid. U.S. Pat. US4.690.826.
- HALE, M.B. (1969). *Food Technol.*, **23**, 107.
- HALVARSON, H. (1973). *J. Food Sci.*, **38**, 310.
- HAMMES, W.P., RÖLZ, I. y BAUTLEON, A. (1985). *Fleischwirtsch.*, **65**, 629.
- HANNINGTON, E. (1967). *Brit. Med. J.*, **2**, 550.

- HANNINGTON, E., HORN, M. y WILKINSON, M. (1970). **Migraine Symp. 3rd. London.** Heinemann Medical Books. London, p. 113.
- HAREL, S. y KANNER, J. (1985). **J. Agric. Food Chem.**, **33**, 1186.
- HAREL, S., SALAN, M.A. y KANNER, J. (1988). **Free Rad. Res. Comm.**, **5**, 11.
- HARTLEY, B.S. (1960). **Ann. Rev, Biochem.**, **29**, 45.
- HARTMANN, T. (1967). **Z. Pflanzenphysiol.**, **57**, 368.
- HASSAN, H.N. y ABO-ZEID, N.A. (1988). **Alexandria Sci. Exch.**, **9**, 211.
- HECHELMAN, H. y KASPROWIAK, R. (1991). **Fleischwirtsch.**, **71**, 1303.
- HECHELMAN, H., LÜCKE, F.-K. y SCHILLINGER, U. (1988). **Mittbl. Bundesanst. Fleischforsch.**, **100**, 7956.
- HEGAZI, F.Z. y ABO-ELNAGA, I.G. (1987). **Nahrung**, **31**, 225.
- HEWITT, E.J., Mac KAY, D.A.M., KONIGSBACHER, K.S. y HASSELSTROM, T. (1956). **Food Technol.**, **10**, 487.
- HILL, R.L. (1965). **Advan. Protein Chem.**, **20**, 37.
- HOFFMANN, T., DUNN, B.M. y FINK, A.L. (1984). **Biochemistry**, **23**, 5241.
- HOFMANN, H.P. y SCHARNER, E. (1980). **Die nahrung**, **24**, 285.
- HUSTAD, G.O., CEVERNY, J.G., TRENK, H., DEIBEL, R.H., KAUTTER, D.A., FAZIO, T., JOHNSTON, R.W. y KOLARI, O. (1973). **Appl. Microbiol.**, **26**, 22.
- IGENE, O., KING, J.A., PEARSON, A.M. y GRAY, J.I. (1979). **J. Agric. Food**

Chem., 27, 838.

IGENE, O. y PEARSON, A.M. (1979). **J. Food Sci., 44, 1285.**

IMPOOLSUP, A., BHUMIRATANA, A. y FLEGEL, T. (1982). **Appl. Environ. Microbiol., 42, 619.**

INCZE, K. (1987). **Fleischwirtsch., 67, 445.**

INCZE, K. (1992). **Fleischwirtsch., 72, 58.**

INGRAM, M. y KITCHELL, A.G. (1967). **J. Food Technol., 2,1.**

INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION (I.S.O.). Norma TC 34/SC 12.

JARRETT, W.D., ASTON, J.W. y DULLEY, J.R. (1982). **Aust. J. Dairy Technol., 37, 55.**

JOHNSON, J.A., ROONEY, L. y SALEM, A. (1966). **Amer. Chem. Soc., Publ., 56, 153.**

JOLLY, R.C. y KOSIKOWSKY, F.V. (1975). **J. Agric. Food Chem., 23, 1175.**

KALINOWSKY, L., FRACKIEWICZ, E. y JANISZEWSKA, L. (1982). **Proc. XXI Int. Dairy Con., vol. 1, libro 2, 500.** Mir Publishers, Moscú.

KAMINOGOWA, S., NINIMYA, T., y YAMAGUCHI, K. (1984). **J. Dairy Sci., 67, 2483.**

KANG, C.K., DONNELLY, T.H. y SODLOWSKY, R.F. (1981). **J. Food Sci., 46, 702.**

KANNER, J., HAREL, S. y GRANIT, R. (1992). **Proc. 38th Int. Con. Meat Sci. Technol. Clermont-Ferrand. Vol. 1, 111.**

- KATAOKA, K., NAKAE, T., UENO, M., NUKADA, K. y OTANI, K. (1987). **Jpn. J. Zootech. Sci.**, **58**, 107.
- KATO, H., RHUE, M.R. y NISHIMURA, T. (1989). Role of free amino acids and peptides in food taste. En *Flavor chemistry. Trends and developments*. R. Teranishi, R.G. Buttery y F. Shashidi (eds.). **ACS Symposium series**, **388**, 158.
- KATSARAS, K. y BUDRAS, K.-D. (1992). **Meat Sci.**, **31**, 121.
- KELLER, J.E., SKELLEY, G.C. y ACTON, J.C. (1974). **J. Milk Food Technol.**, **37**, 101.
- KENNEY, P.B. y HUNT, M.C. (1990). **Meat Sci.**, **27**, 173.
- KHAYAT, A. y SCHWALL, D. (1983). **Food Technol.**, **37**, 130.
- KIELY, P.J., NOWLIN, A.C. y MORIARITY, J.H. (1960). **Cereal Sci. Today**, **5**, 273.
- KILARA, A. (1985a). **Process Biochem.**, **20**, 35.
- KILARA, A. (1985b). **Process Biochem.**, **20**, 149.
- KIRBY, C.J., BROOKER, B.E. y LAW, B.A. (1987). **Int. J. Food Sci. Technol.**, **22**, 355.
- KITCHELL, A.G. y SHAW, B.G. (1975). Lactic acid bacteria in fresh and cured meat. En *Lactic acid bacteria in beverages and foods*. J.g. Carr, C.C. Whiting y C.V. Culting (eds.). Academic Press. Londres.
- 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.
- KLEMENT, J.T., CASSENS, R.G., FENNEMA, O.R. y GREASER, M.L. (1975). **J. Animal Sci.**, **41**, 554.
- KNIGHT, P. y PARSONS, N. (1988). **Meat Sci.**, **24**, 275.
- KOEHLER, P.E. y EITENMILLER, R.R. (1978). **J. Food Sci.**, **43**, 1245.
- KOOHMARIE, M. (1992). **Proc. 38th Int. Con. Meat Sci. Technol.** Clermont-Ferrand (Francia), p. 61.
- KOOHMARIE, M., SCHOLHMEYER, J.E. y DUTSON, T.R. (1986). **J. Food Sci.**, **51**, 28.
- KÖRMENDY, L. y GANTNER, G. (1962). **Fleischwirtsch.**, **42**, 774.
- KOSIKOWSKY, F.V. e IWASAKY, T. (1975). **J. Dairy Sci.**, **58**, 963.
- KRISTOFFERSEN, T., MIKOLAJCIK, E.M. y GOULD, I.A. (1967). **J. Dairy Sci.**, **50**, 292.
- KUNZ, B. (1989). **Proc. 35th Int. Con. Meat Sci. Technol.** Copenhagen, vol. I, 176.
- LALOI, P., ATLAN, D., BLANC, M, GILBERT, C. y PORTALIER, R. (1991). **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **36**, 196.
- LAMANNA, C. y MALLETTE, M.F. (1965). Nutrition of bacteria. En *Basic Bacteriology*. 3ª ed. The Williams and Wilkins Company. Baltimore.
- LANGNER, H.J. (1969). **Die Fleischwirtsch.**, **49**, 1475.

- LANGNER, H.J. (1972). *Die Fleischwirtsch.*, **52**, 1299.
- LANGNER, H.J., HECKEL, U. y MALEK, E. (1970). *Fleischwirtsch.*, **50**, 1193.
- LAW, B.A. (1979). *J. Appl. Bacteriol.*, **46**, 455.
- LAW, B.A. (1980). Transport and utilization of proteins by bacteria. En *Microorganisms and Nitrogen Sources*. J.W. Payne (ed.). John Wiley & Sons Ltd. Chichester.
- LAW, B.A. (1984a). The accelerated ripening in cheese. En *Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milks*. Elsevier Applied Science Publishers. Londres.
- LAW, B.A. (1984b). *Progr. in Ind. Microbiol.*, **19**, 245.
- LAW, B.A. (1985). Accelerated cheese ripening using modern techniques. En *The International seminar on the production and utilization of ewe's and goat's milk*. p.62
- LAW, B.A., CASTAÑÓN, M.J. y SHARPE, M.E. (1976). *J. Dairy Res.*, **43**, 301.
- LAW, B.A. y KOLSTAD, J. (1983). *Antonie van Leeuwenhoek*, **49**, 225.
- LAW, B.A. y WIGMORE, A.S. (1982). *J. Dairy Res.*, **49**, 137.
- LAW, B.A. y WIGMORE, A.S. (1983). *J. Dairy Res.*, **50**, 519.
- LAW, B.A. y WIGMORE, A.S. (1985). *J. Soc. Dairy Technol.*, **38**, 86.
- LAWRIE, R.A. (1974). En *Meat Science*. II edition. Pergamon Press. Oxford, Gran Bretaña.
- LEE, Y.B., KING, Y.S. y ASHMOR, C.R. (1986). *J. Food Sci.*, **51**, 20.

- LEHNINGER, A.L. (1984). En *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular*. 2ª ed. Ed. Omega. Barcelona.
- LEISTNER, L. (1984). *Food Technol. Aust.*, **36**, 404.
- LEISTNER, L. (1987). *Fleischwirtsch. español*, **1/87**, 38.
- LEISTNER, L. (1990). *Proc. 36th Int. Con. Meat Sci. Technol.* La Habana. p. 842.
- LEISTNER, L. y BEM, Z. (1970). *Fleischwirtsch.*, **50**, 350.
- LEISTNER, L. y ECKARDT, C. (1981). Schimmelpilze und Mykotoxine in Fleisch und Fleischerzeugnissen. En *Mykotoxine in Lebensmitteln*. J. Reiss (ed.). Gustav Fischer Verlag. Stuttgart.
- LEISTNER, L., MAING, I.Y. y BERGMANN, E. (1975). *Fleischwirtsch.*, **55**, 559.
- LEMIEUX, L. y SIMARD, R.E. (1992). *Le Lait*, **72**, 335.
- LEON CRESPO, F., BARRANCO, A., PENEDO, J.C., BELTRAN, F., MATA, C., MONTERO, E. y MARTINS, C. (1985). *Alimentaria*, **163**, 57.
- LIEPE, H.U. (1982). Starter cultures in meat production. En *Biotechnology*. G. Reed (ed.). Verlag-Chemie. Weinheim. vol. 5.
- LIEPE, H.U. (1983). *Fleischwirtsch. español*, **33**.
- LÖFFLER, A. (1986). *Food Technol.*, **40**, 63.
- LOIS, A.L., GUTIERREZ, L.M., ZUMALACARREGUI, J.M. y LOPEZ, A. (1987). *Meat Sci.*, **19**, 169.
- LOPEZ-LORENZO, P., BURGOS, J. y SANZ, B. (1962). *Anales Fac. Vet. Leon*, **8**,

99.

LU, J. y TOWNSEND, W.E. (1973). **J. Food Sci.**, **38**, 837.

LÜCKE, F.-K. (1984). Fermented sausages. En *Microbiology of Food Fermentations*. B.J.B.Wood (ed.). Applied Science Pub. Londres.

LÜCKE, F.-K. (1986). **Fleischwirtsch.**, **66**, 1505.

LÜCKE, F.-K. y HECHELMAN, H. (1987). **Fleischwirtsch.**, **67**, 307.

MACDONALD, B., GRAY, J.L., KAKUDA, Y. y LEE, M.L. (1980). **J. Food Sci.**, **45**, 889.

MAGA, J.A. (1978). **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, **10**, 373.

MAIER, H.G. (1970). **Angew. Chem.**, **9**, 917.

MAN, J.C. DE, ROGOSA, M. y SHARPE, M.E. (1960). **J. Appl. Bacteriol.**, **23**, 130.

MARSHALL, V.M.E. y LAW, B.A. (1984). En *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*. F.L. Davis y B.A. Law (eds.). Elsevier Applied Science Publishers. Londres.

MARTIN, M. (1975). Technologie du saucisson sec: contribution a l'étude des phénomènes physicochimiques. Tesis doctoral. Universidad Paul Sabatier de Toulouse.

MATOKA, T. y HATA, T. (1972). **Agric. Biol. Chem.**, **36**, 1423.

Mc DOUGALL, D.B., MOTRAM, D.S. y RHODES, D.N. (1975). **J. Sci. Food Agric.**, **26**, 1743.

- Mc MEEKIN, T.A. (1982). Microbial spoilage of meats. En *Developments in Food Microbiology*. R. Davies (ed.). Applied Science Publishers. Londres.
- MELGAR, M.J., BERIAIN, M.J. y BELLO, J. (1990). *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.*, **30**, 363.
- MENDOZA, S., FLORES, J. y SILLA, H. (1983). *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.*, **23**, 86.
- MIHALYI, V. y KÖRMENDY, L. (1967). *Food Technol.*, **21**, 1398.
- MIRVISH, S.S., WALLCAVE, L., EAGEN, M. y SHUVIK, P. (1972). *Science*, **111**, 65.
- MIYAKAWA, H., KOBAYASHI, S., SHIMAMMA, S. y TOMITA, M. (1992). *J. Dairy Sci.*, **75**, 27.
- MÖHLER, K. (1984). En *El curado*. Ed. Acribia. Zaragoza.
- MONTEL, M.C., TALON, R., BERDAGUE, J.L. y CANTONNET, M. (1993). *Meat Sci.*, **35**, 229.
- MONTEL, M.C., TALON, R., CANTONNET, M. y CAYROL, J. (1992). *Proc. 38th Int. Cong. Meat Sci. Technol.* Clermont-Ferrand. Vol. 4, 811.
- MORIHARA, K., TSUZUKI, H. y OKA, T. (1968). *Arch. Biochem. Biophys.*, **123**, 572.
- MOSKOWITZ, G.J. (1980). En *The analysis and control of less desirable flavours in food and beverages*. G. Charalambous (ed.). Academic press. Nueva York.
- MOTTRAM, D.S., CROFT, S.E. y PATTERSON, R.L. (1984). *J. Sci. Food Agric.*,

35, 233.

MOTTRAM, D.S. y RHODES, D.N. (1973). *Proc. Int. Symp. Nitrite Meat Prod. Zeist. Pudoc, Wageningen.* p. 161.

NAGY, A., MIHALYI, V. e INCZE, K. (1989). *Fleischwirtsch.*, **69**, 587.

NAKADAI, T., NASUNO, S. e IGUCHI, N. (1977). *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 261.

NAKAMURA, M., WADA, Y., SAWAYA, H. y KAWABALA, T. (1979). *J. Food Sci.*, **44**, 515.

NARAHASHI, Y. (1970). Pronase. En *Methods in enzymology. XIX. Proteolytic enzymes.* G.E. Pearlman y L. Lorand (eds.). Academic Press. Nueva York.

NARAHASHI, Y., SHIBUYA, K. y YANAGITA, M. (1968). *J. Biochem. (Tokyo)*, **64**, 427.

NATH, K.R. y LEDFORD, R.A. (1972). *J. Dairy Sci.*, **10**, 1424.

NÆS, H., CHRZANOWSKA, J., NISSEN-MEYER, J., PEDERSEN, B.O. y BLOM, H. (1991). *Proc. 37th Int. Con. Meat Sci. Technol.* Kulmbach, vol. 2, 914.

NÆS, H. y NISSEN-MEYER, J. (1992). *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 313.

NÆS, H., PEDERSEN, B.O., HOLCK, A.L., AXELSSON, L., HOLTEN, V. y BLOM, H. (1992). *Proc. 38th Int. Con. Meat Sci. Technol.* Clermont-Ferrand, vol. 4, 815.

NESTOROV, N., GADZHEVA, D., BAYCHEV, I. y GATEVA, A. (1982). *Proc. 28th Eur. Meet. Meat Res. Work.*, 192.

NEY, K.H. (1972). *Z. Lebens. Unters. Forsch.*, **148**, 321.

- NIETO, P., MOLINA, I., FLORES, J. y BERMELL, S. (1989). **Proc. 35th Int. Con. Meat Sci. Technol.**, p. 323.
- NIINIVAARA, F.P. (1955). **Acta Agralia Fennica**, 85, 1.
- NIINIVAARA, F.P. (1991). **Proc. 44th Annual Reciprocal Meat Conference.** Kansas State University. Manhattan, KS. p. 59.
- NIINIVAARA, F.P., POHJA, M. y KOMULAINEN, S.E. (1961). **Proc. 7th Eur. Meet. Meat Res. Work.** Varsovia.
- NIINIVAARA, F.P., POHJA, M. y KOMULAINEN, S.E. (1964). **Food Technol.**, 18, 147.
- NISHIMURA, T. y KATO, H. (1988). **Food Reviews International**, 4, 175.
- NISHIMURA, T., RHUE, M.R., OKITANI, A. y KATO, H. (1988). **Agric. Biol. Chem.**, 52, 2323.
- NIVEN, G.W. (1991). **J. Gen. Microbiol.**, 137, 1207.
- NOGUCHI, M., ARAI, S., YAMASHITA, M., KATO, H. y FUJIMAKI, M. (1975). **J. Agric. Food Chem.**, 23, 49.
- NORDAL, J. y SLINDE, E. (1980). **Appl. Environ. Microbiol.**, 40, 472.
- NUÑEZ, M., GUILLEN, A.M., RODRIGUEZ-MARIN, M.A., MARCILLA, A.M., GAYA, P. y MEDINA, M. (1991). **J. Dairy Sci.**, 74, 4108.
- NURMI, E. (1966). **Acta Agralia Fennica**, 108, 1.
- OFFER, G. (1984). **Proc. 30th Europ. Meet. Meat Res. Work.** Bristol, p.

87.

- OKITANI, A., OTSUKA, Y., KATAKAI, R., KONDO, Y. y KATO, H. (1981). *J. Food Sci.*, **46**, 47.
- OLANO, A., RAMOS, M. y MARTINEZ-CASTRO, I. (1983). *Food Chem.*, **10**, 57.
- ORDOÑEZ, J.A., ASENSIO, M.A., GARCIA, M.L., SELGAS, M.D. Y SANZ, B. (1989). *Fleischwirtsch.*, **69**, 1046.
- ORDOÑEZ, J.A., BARNETO, R. y RAMOS, M. (1978). *Milchwissenschaft*, **33**, 609.
- ORDOÑEZ, J.A. y BURGOS, J. (1980). *Milchwissenschaft*, **35**, 69.
- ORDOÑEZ, J.A., DE PABLO, B., PEREZ DE CASTRO, B., ASENSIO, M.A. y SANZ, B. (1991). *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 668.
- ORTH, R. (1977). *Ann. Nutr. Alim.*, **31**, 617.
- ORTIZ DE APODACA, M.J., SELGAS, M.D. y ORDOÑEZ, J.A. (1993). *Food Res. Int.*, **26**, 319.
- PALUMBO, S.A. y SMITH, J.L. (1977). En *Enzymes in food and beverage processing*. ACS Symposium Series nº 47. R.L. Ory y A.J. St. Angelo (eds.). Department of Agriculture, U.S.A.
- PALUMBO, S.A., ZAIKA, L.L., KISSINGER, J.C. y SMITH, J.L. (1976). *J. Food Sci.*, **41**, 12.
- PAREJO, I., ORDOÑEZ, J.A., GARCIA, M.L. y LOPEZ, L. (1979). VII Congreso Nacional de Microbiología. Cadiz. Com. 314.
- PEARSON, D. (1973). En *Laboratory Techiques in Food analysis*. Butterworths & Co. Pub. Londres.

- PELISSIER, J.P. y MANCHON, P. (1976). *J. Food Sci.*, **41**, 231.
- PENNY, I.F., ETHERINGTON, D.J., REEVES, J.D. y TAYLOR, M.A.J. (1984). *Proc. 30th Eur. Meet. Meat Res. Work.* Bristol, p.133.
- PENNY, I.F., TAYLOR, M.A.J., HARRIS, A.G. y ETHERINGTON, D.J. (1985). *Biochim. Biophys. Acta*, **829**, 244.
- PETRITSCHKE, A., LYNEN, F. y BELITZ, H.D. (1972). *Lebensm. Wiss. Technol.*, **5**, 77.
- PETTERSON, H.E. y SJÖSTRÖM, G. (1975). *J. Dairy Res.*, **42**, 313.
- PEZACKI, W. (1979). *Fleischwirtsch.*, **59**, 218.
- PEZACKI, W. y PEZACKA, E. (1980). Parafermentacyjue zmiany frakcji białkowyck w wedlinach surowych. V. Zmiana skladn aminolwasowego bialek. Manuscript. AR. Poznan.
- PEZACKI, W. y PEZACKA, E. (1986). *Acta Alimentaria Polonica*, **XII**, 121.
- PEZACKI, W. y SZOSTAK, D. (1962). *Fleischwirtsch.*, **42**, 180.
- PONTO, L.B., PERRY, P.J., LISKOW, B.I. y SEABA, H.H. (1977). *Am. J. Hosp. Pharm.*, **34**, 954.
- PRITCHARD, G.G. y COOLBEAR, T. (1993). *FEMS Microbiol. Rev.*, **12**, 179.
- PUGLIA, M.L. y SEPERICH, G.J. (1983). *83rd Annual Meeting. American Society for Microbiology.* Abstract 083.
- PYRCZ, J. y PEZACKI, W. (1975). *Fleischwirtsch.*, **55**, 217.

- PYRCZ, J. y PEZACKI, W. (1981). *Fleischwirtsch.*, **61**, 446.
- REITER, B., SOROKIN, Y., PICKERING, A. y HALL, A.J. (1969). *J. Dairy Res.*, **36**, 65.
- RENNER, E. (1987). Nutritional aspects of cheese. En *Cheese: chemistry, physics and microbiology. Vol. 1.1. General aspects*. P.F. Fox (ed.). Elsevier Applied Science. Londres.
- RESOLUCION DE LA SECRETARIA DE ESTADO PARA LA SANIDAD del 21 de Agosto de 1979, B.O.E. del 12 de Noviembre de 1979.
- REUTER, G. (1971). *Die Fleischwirtsch.*, **51**, 945.
- REUTER, G., LANGNER, H.J. y SINELL, H.-J. (1968). *Fleischwirtsch.*, **48**, 170.
- REVEAH, S. y LEBault, J.M. (1989). *Le Lait*, **69**, 281.
- RHEE, K.S., ZIPRIN, Y.A. y ORDONEZ, G. (1987). *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 1013.
- RHEINBABEN, K. von y HADLOCK, R. (1979). *Fleischwirtsch.*, **59**, 1321.
- RICE, S.L., EITENMILLER, R.R. y KOEHLER, P.E. (1975). *J. Milk Food Technol.*, **38**, 256.
- ROBERTSON, P.S. y PERRY, K.D. (1961). *J. Dairy Res.*, **28**, 245.
- RODRIGUEZ, J.M., SOBRINO, O.J., FERNANDEZ, M.F., HERNANDEZ, P.E. y SANZ, B. (1989). *Proc. 35th Int. Con. Meat Sci. Technol.* Copenhagen. Vol. 2, 308.
- ROZIER, J. (1969). *Rec. Med. Vet.*, **145**, 1069.

- ROZIER, J. (1971). *Fleischwirtsch.*, **51**, 1063.
- SAJBER, C., KARAKAS, R. y MITIC, P. (1971). *Proc. 17th Eur. Meet. Meat Res. Work.* Bristol.
- SALVESEN, G. y NAGASE, H. (1989). Inhibition of proteolytic enzymes. En *Proteolytic enzymes. A practical approach*. R.J. Beynon y J.S. Bond (eds.). IRL Press. Oxford University Press.
- SANDHOLM, M., NURMI, E. y PEKKAN, T. (1972). *Food Sci. Technol. (Swiss)*, **5**, 21.
- SANDLER, M., YODIM, M.B.H. y HANNINGTON, E. (1974). *Nature*, **250**, 335.
- SANTAMARIA, I., LIZARRAGA, T., ASTIASARAN, I. y BELLO, J. (1992a). *Alimentaria*, **229**, 23.
- SANTAMARIA, I., LIZARRAGA, T., ASTIASARAN, I. y BELLO, J. (1992b). *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.*, **32**, 431.
- SANTOS, C., JALON, M. y MARINE, A. (1985). *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.*, **25**, 363.
- SANTOS-BUELGA, C., PEÑA-EGIDO, M.J. y RIVAS-GONZALO, J.C. (1986). *J. Food Sci.*, **51**, 518.
- SANZ, B. (1988). *El ayer, hoy y mañana de la Bromatología*. Instituto de España. Real Academia de Farmacia. Madrid, 1988.
- SANZ, B., SELGAS, M.D., PAREJO, I. y ORDOÑEZ, J.A. (1988). *Int. J. Food Microbiol.*, **6**, 199.
- SARGEANT, J.G., BOWIE, H.M. y BILLINGTON, M.J. (1993). *Meat Sci.*, **34**, 39.

- SARRA, P.G., CABRAS, M. y DELLAGLIO, F. (1982). *Ind. Aliment.*, **21**, 477.
- SARRAGA, C., GIL, M. y GARCIA-REGUEIRO, J.A. (1993). *J. Sci. Food Agric.*, **62**, 71.
- SAVIC, Z., SHENG, Z.K. y SAVIC, I. (1988). *Fleischwirtsch.*, **68**, 612.
- SCHALINATUS, E. y BEHNKE, V. (1975). *Nahrung*, **19**, 447.
- SCHECHTER, I. y BERGER, A. (1968). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **32**, 898.
- SCHORMULLER, J. y TANZLER, H. (1959). *Z. Lebens. Unters. Forsch.*, **109**, 234.
- SELGAS, M.D. (1985). Aptitud tecnológica del género *Micrococcus*: selección de cepas iniciadoras. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- SELGAS, M.D., GARCIA, M.L., GARCIA DE FERNANDO, G. y ORDOÑEZ, J.A. (1993). *Fleischwirtsch.*, **73**, 1164.
- SELGAS, M.D., ORDOÑEZ, J.A. y SANZ, B. (1986). *Proc. 32nd Eur. Meet. Meat Res. Work. Gante*. p. 251.
- SELGAS, M.D., SANZ, B. y ORDOÑEZ, J.A. (1988). *Food Microbiol.*, **5**, 185.
- SEN, N.P. (1969). *J. Food Sci.*, **32**, 22.
- SESMA, B. y RODRIGUEZ, B.A. (1976). *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.*, **16**, 107.
- SHAW, B.G. y HARDING, CH.D. (1984). *J. Appl. Bacteriol.*, **56**, 25.

- SHAW, B.G. y LATTY, J.B. (1982). *J. Appl. Bacteriol.*, **52**, 219.
- SILLA, M.H. (1989). *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.*, **29**, 1.
- SIMON, S., ELLIS, D.E., MACDONALD, B.D., MILLER, D.G., WALDMAN, R.C. y WESTENBERG, D.O. (1973). *J. Food Sci.*, **38**, 919.
- SKEJLKVÅLE, R., TJABERG, T. y VALLAND, M. (1974). *J. Food Sci.*, **39**, 520.
- SLEMR, J. (1981). *Fleischwirtsch.*, **61**, 921.
- SLUYTERMAN, L.A.Æ. (1967). *Biochim. Biophys. Acta.*, **139**, 430.
- SMID, E.J., POOLMAN, B. y KONINGS, W.N. (1991). *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2447.
- SMITH, J.L. y ALFORD, J.A. (1968). *J. Food Sci.*, **33**, 93.
- SMITH, J.L. y PALUMBO, S.A. (1973). *Appl. Microbiol.*, **26**, 489.
- SMITH, J.L. y PALUMBO, S.A. (1983). *J. Food Prot.*, **46**, 997.
- SMITH, T.A. (1970). *Phytochemistry*, **9**, 1479.
- SODEK, J. y HOFMANN, T. (1970). Microbial acid proteinases. En *Methods in enzymology. XIX. Proteolytic enzymes*. G.E. Pearlman y L. Lorand (eds.). Academic Press. Nueva York.
- SOKOLOV, A.A. y TCHEKHOVSKAYA, V.T. (1971). *Proc. 17th Eur. Meet. Meat Res. Works. Con. Bristol*, p. 767.
- SOOD, V.K. y KOSIKOWSKY, F.V. (1979). *J. Dairy Sci.*, **62**, 1865.
- SPINELLI, A.M., LAKRITZ, L. y WASSERMAN, A.E. (1974). *J. Agric. Food*

Chem., **22**, 1026.

STADHOUDERS, J. y VERINGA, H.A. (1973). **Neth. Milk Dairy J.**, **27**, 77.

STANCULESCU, C., SANDULESCU, C. y SBIRCEA, C. (1970). **Proc. 16th Meet. Eur. Meat Res. Work.** Varna, Bulgaria.

STEELE, J.L. y ÜNLÜ, G. (1992). **Food Technol.**, **46**, 128.

STIEBING, A. y RÖDEL, W. (1988). **Fleischwirtsch. español**, **2/1988**, 30.

SWAISGOOD, H.E. y HORTON, H.R. (1989). Immobilized enzymes as processing aids or analytical tools. En *Biocatalysis in Agricultural Biotechnology*. J.R. Whitaker y P.E. Sonnet (eds.). American Chemistry Society. Washington.

TABOR, H., ROSENTHAL, S.M. y TABOR, C.M. (1958). **J. Biol. Chem.**, **233**, 907.

TABOR, H. y TABOR, C.M. (1964). **Pharmacol. Rev.**, **1**, 245.

TALON, R., MONTEL, M.C. y CANTONNET, M. (1992). **Proc. 38th Int. Con. Meat Sci. Technol.** Clermont-Ferrand, p. 843.

TAN, P.S.T., CHAPOT-CHARTIER, M.P., POS, K.M., ROUSSEAU, M., BOQUIEN, C.Y., GRIPON, J.C. y KONINGS, W.N. (1992). **Appl. Environ. Microbiol.**, **58**, 285.

TAN, P.S.T., POOLMAN, B. y KONINGS, W.N. (1993). **J. Dairy Res.**, **60**, 269.

TAYLOR, S.L., KEEFE, T.J., WINDHAM, E.S. y HOWELL, J.F. (1982). **J. Food Protect.**, **45**, 455.

THOMAS, T.D., JARVIS, B.D.W. y SLIPPER, N.A. (1974). **J. Bacteriol.**, **118**, 329.

- TOLDRA, F., RICO, E. y FLORES, J. (1992). **Biochimie**, **74**, 291.
- TOLDRA, F., RICO, E. y FLORES, J. (1993). **J. Sci. Food Agric.**, **62**, 157.
- TOTH, L. (1983). **Fleischwirtsch.**, **63**, 208.
- TOURAILLE, C. y GOUTENFONGEA, R. (1985). **Sci. Aliments**, **5**, 313.
- TOURNER, C. y DAUDIN, J. (1983). **Microbiol. Alim. Nutr.**, **1**, 337.
- TOWNSEND, W.E., DAVIES, C.E. y LYON, C.E. (1978). **Proc. 24th Europ. Meet. Meat Res. Work.** Kulmbach.
- TREVANT, M.D., BOFFEY, S., GOULDING, K.H. y STANBURY, P. (1987). En *Biotechnology. The biological principles*. Taylor and Francis Eds. Nueva York.
- TROLLER, J.A. y CHRISTIAN, J.H.B. (1978). En *Water activity in foods*. Academic Press. Nueva York.
- TROLLER, J.A. y STINSON, J.V. (1975). **J. Food Sci.**, **40**, 802.
- UNDERKOFLE, L.A. (1976). Microbial enzymes. En *Industrial microbiology*. B.M. Miller y W. Litski (eds.). McGraw-Hill Book Company.
- VANDEKERCKHOVE, P. (1977). **J. Food Sci.**, **42**, 283.
- VENTANAS, J., CORDOBA, J.J., ANTEQUERA, T., GARCIA, C., LOPEZ-BOTE, C. y ASENSIO, M.A. (1992). **J. Food Sci.**, **57**, 813.
- VERPLAETSE, A., DE BOSSCHERE, M. y DEMEYER, D. (1989). **Proc. 35th Int Con. Meat Sci. Technol.** Copenhagen, p. 815.
- WALLACH, D.P. (1968). **J. Lip. Res.**, **9**, 200.

- WALTERS, C.L., CASSELDEN, R.J. y TAYLOR, A. McM. (1967). **Biochim. Biophys. Acta.**, **143**, 310.
- WARDLAW, F.B., SKELLEY, G.C., JOHNSON, M.G. y ACTON, J.C. (1973). **J. Food Sci.**, **38**, 1228.
- WEAVER, J.C. y KRAGER, M. (1978). **J. Food Sci.**, **43**, 579.
- WEISENFELS, M. (1992). **Fleischwirtsch. español**, **2/1992**, 3.
- WESTERBERG, D.O. (1973). **Proc. Recip. Meat Conf.**, p. 45.
- WHITAKER, J.R. (1972). The proteolytic enzymes. En *Principles of enzymology for the food sciences*. Food Science and Technology Series. Marcel Dekker Inc. Nueva York.
- WILSON, S.-A., YOUNG, O.A., COOLBEAR, T. y DANIEL, R.M. (1992). **Meat Sci.**, **32**, 93.
- WIRTH, F. (1973). **Fleischwirtsch.**, **53**, 363.
- WIRTH, F. (1979). **Proc. 25th Eur. Meet. Meat Res. Work.** Budapest. p. 587.
- WIRTH, F. (1984). **Mitteilungsblatt der BAFF**, **84**, 5924.
- WOHLRAB, Y. y BOCKELMANN, W. (1992). **Int. Dairy J.**, **2**, 345.
- WOODS, F. y KINSELLA, J. (1980). **J. Food Sci.**, **45**, 1200.
- YAMAGUCHI, S. (1967). **J. Food Sci.**, **32**, 473.
- YAMASAKI, Y. y MAEKAWA, K. (1978). **Agric. Biol. Chem.**, **42**, 1761.

- YANG, C. y SEPULVEDA, F. (1985). **J. Chromatograph.**, **346**, 413.
- YOUNATHAN, M.T. y WATTS, B.M. (1959). **J. Food Res.**, **24**, 728.
- YU, S.U. y TAN, L.K. (1990). **Int. J. Food Sci. Technol.**, **25**, 204-208.
- ZAIKA, L.L. y KISSINGER, J.C. (1981). **J. Food Sci.**, **46**, 1205.
- ZAIKA, L.L., ZELL, T.E., SMITH, J.L., PALUMBO, S.A. y KISSINGER, J.C. (1976).
J. Food Sci., **41**, 1457.
- ZEVACO, C. y GRIPON, J.C. (1988). **Le Lait**, **68**, 393.
- ZIMMERMAN, U.P. y SCHLAEFFER, W.W. (1988). **Arch. Biochem. Biophys.**,
266, 462.